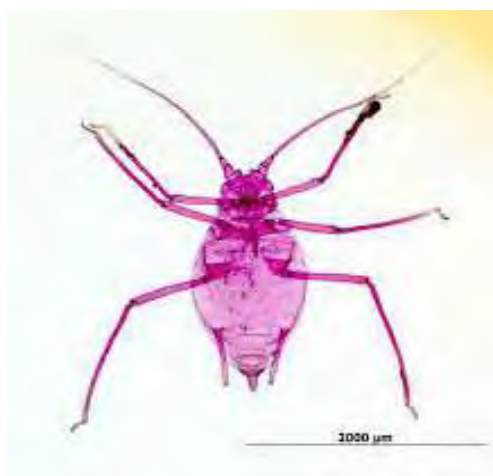




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΣΟΥΡΜΠΙΑΤΗΣ ΠΑΥΛΟΣ-ΝΙΚΟΛΑΟΣ

“Έλεγχος πληθυσμών του *Myzus persicae* για τη μεταλλαγή R81T που προσδίδει ανθεκτικότητα σε νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα”





UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

SOURMPATIS PAULOS-NIKOLAOS

“Monitoring of the *M. persicae* for the mutation R81T witch provides resistance to neonicotinoids insecticides”



Στοιχεία πτυχιακής εργασίας

Το εργαστηριακό – πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο “Έλεγχος πληθυσμών του *Myzus persicae* για τη μεταλλαγή R81T που προσδίδει ανθεκτικότητα σε νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα” πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2014 – Απρίλιος 2015 υπό την επίβλεψη του μέλους ΕΔΙΠ Δρα Ιωάννη Τ. Μαργαριτόπουλου.

Επιβλέπων καθηγητής: Ι. Μαργαριτόπουλος

Μέλη τριμελούς πτυχιακής: Ζ. Μαμούρης
Ι. Μαργαριτόπουλος
Κ. Σταμάτης

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας: 19 Φεβρουαρίου 2016

Πρόλογος

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος ΕΔΙΠ Δρα Ιωάννη Τ. Μαργαριτόπουλο για την ανάθεση και επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Τον ευχαριστώ βαθύτατα για την καθοδήγηση και την βοήθειά του, και κυρίως για τις γνώσεις που μου μετέφερε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Ιδιαίτερα όμως, θέλω να εκφράσω την εκτίμηση μου προς το πρόσωπό του για την δυνατότητα που μου έδωσε να έρθω σε μια πρώτη επαφή με το χώρο της επιστημονικής έρευνας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά, τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Ζήση Μαμούρη και το μέλος ΕΔΙΠ Δρα Κων/νο Σταμάτη που δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας μου καθώς και για όλες τις γνώσεις που μου μετέφεραν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρα Κώστα Βουδούρη για τη βοήθεια και την εκπαίδευση που μου προσέφερε στο εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας καθώς και για το εύθυμο κλίμα και για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί στον χώρο του εργαστηρίου.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Περιεχόμενα	6
Περίληψη	8
1.Αφίδα	10
1.1.Η βιολογία της αφίδας	12
1.2Εξειδίκευση αφίδων	18
2.Εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα	23
2.1.Δομή και κατανομή της παγκόσμιας αγοράς των εντομοκτόνων	25
2.2.Νέα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα στην ελληνική αγορά	26
3.Ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα	29
3.1.Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	32
3.1.1. Μετάλλαξη του β νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της αφίδας <i>Myzus persicae</i> σε νικοτινοειδή εντομοκτόνα	33
3.1.2.Η εξέλιξη της ανθεκτικότητας της <i>Myzus persicae</i> σε εντομοκτόνα	37
3.1.3.Ανθεκτικότητα της <i>Myzus persicae</i> καπνού και ροδάκινου σε εντομοκτόνα στην Ελλάδα	41
4.Υλικά και μέθοδοι	42
4.1.Συλλογή Αφίδων	42
4.1.1.Δείγματα Αφίδων	43
4.2.Απομόνωση DNA	43
4.2.1.Μέθοδος Celex	43

4.2.2.Μεθοδος με tris-HCL	43
4.3.PCR και Ηλεκτροφόρηση	45
4.3.1.PCR	45
4.3.2.Παρασκευή διαλύματοςTAEκαιGel Αγαρόζης	48
4.3.3.Ηλεκτροφόρηση	48
4.4.Κοπήμε ένζυμα περιορισμού και Ηλεκτροφόρηση	50
5.Αποτελέσματα	52
6.Συζήτηση	53
7.Βιβλιογραφία	56

Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή μελετάται η γενετική και μορίακη πληθυσμών, που απαντώνται στην Ελλάδα, του είδους της αφίδας *Myzus persicae* ώστε να παρατηρηθεί εάν μια συγκεκριμένη μετάλλαξη που προσδίδει ανθεκτικότητα σε νικοτινοειδή αντιβιοτικά έχει εισχωρήσει στους πληθυσμούς του ελλαδικού χώρου. Το *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) είναι ένα είδος αφίδας με μεγάλη οικονομική σημασία για πολλές καλλιέργειες λόγω των άμεσων και έμμεσων ζημιών που προκαλεί. Θεωρείται ο πιο σοβαρός φορέας ιών, καθώς μεταδίδει αποτελεσματικά περισσότερους από 100 ιούς φυτών. Το είδος αυτό είναι εχθρός του καπνού, της ροδακινιάς και άλλων ποωδών καλλιεργειών. Μελετήθηκαν 132 δείγματα κλώνων της αφίδας που συλλέχθηκαν από διάφορα μέρη της Ελλάδας.

Αρχικά κρίθηκε σκόπιμο να αναφερθούμε στη βιολογία της αφίδας και στην εξειδίκευση του κάθε πληθυσμού για να καταλάβουμε κάποια στοιχεία ως προς το υπό μελέτη είδος.

Τα έντομα και τα ακάρεα προκαλούν μείωση 25% της παραγωγής προϊόντων φυτικής προέλευσης στις ανεπτυγμένες χώρες και 40% στις χώρες του τρίτου κόσμου και υποβαθμίζουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Η προστασία των καλλιεργειών από τα έντομα και τα ακάρεα βασίζεται στη χημική καταπολέμηση, με χρήση εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων που εφαρμόζονται στο πλαίσιο προγραμμάτων Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Εχθρών (ΟΔΕ) στις πιο ανεπτυγμένες χώρες.

Επιπλέον, εξετάζεται η ανθεκτικότητα της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer), σε εντομοκτόνα με έμφαση στα νεονικοτινοειδή ως προς αύξηση παραγωγής μεταβολικών ενζύμων, μετάλλαξη της πρωτεΐνης στόχου και τη μετάλλαξη του β νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της αφίδας *Myzus persicae* σε νικοτινοειδή εντομοκτόνα (Basset al 2011 Neuroscience). Μελετάμε την εξέλιξη της ανθεκτικότητας της *Myzus persicae* σε εντομοκτόνα (Bass et al 2014) και την ανθεκτικότητα της *Myzus persicae* καπνού και ροδάκινου σε εντομοκτόνα στην Ελλάδα (Margaritopoulos et al 2007 PMS).

Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν πειράματα απομόνωσης DNA και PCR για την απομόνωση και εν συνεχεία πολλαπλασιασμό του μέρους του γενετικού υλικού των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και κοπή με ένζυμα περιορισμού με σκοπό τον εντοπισμό της υπο αναζήτηση μετάλλαξης.

Τέλος, γίνεται συζήτηση για την εξέλιξη της ανθεκτικότητας της αφίδας στα εντομοκτόνα στην Ελλάδα.

Summary

A mutation that provides *M. persicae* resistant to neonicotinoid insecticides is being researched on aphid populations in Greece. *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) is an aphid species with great economic importance for many crops due to the damage that it causes. It is considered as a serious vector of many viruses as it can transmit effectively more than 100 plant viruses. This particular species hosts tobacco, peach and other herbaceous crops. 132 samples of *M. persicae* clones gathered from areas throughout Greece, were studied.

Firstly, a review about the biology and specialization of the aphid is made, so clues can come about the species that's being studied.

Specifically, insect pests cause 25% reduction of crop products in developed countries, and 40% in countries of the third world. They downgrade the product quality. The crop protection from insect pests is based on chemical insecticides, in the framework of Integrated Pest Management (IPM) programmes in more developed countries.

The resistance of *M. persicae* to insecticides is also being studied, with emphasis on neonicotinoids and the resistance mechanisms such as metabolic enzymes and mutation of the protein target of the insecticides.

In the lab, techniques such as PCR and DNA extraction were used and restriction enzymes as well, as a mean for localizing the mutation. DNA was extracted from individual aphid clones, PCR was performed in order to enhance the target sequence. The use of restriction enzymes localizes the mutation.

The evolution of the aphid resistance to insecticides in Greece is also being discussed.

1. Αφίδα

Οι αφίδες είναι έντομα γνωστά με τα κοινά ονόματα μελίγκρα, ψείρα, μέλουρα και φυτόψειρα. Ξεχωρίζουν από τα άλλα φυτοφάγα έντομα λόγω: α) των αποτελεσματικών μηχανισμών διασποράς και εύρεσης ξενιστή, β) της χρησιμοποίησης, από τα περισσότερα είδη, του χυμού των φυτών ως πηγή τροφής και γ) της παρθενογένεσης. Ανήκουν στην υπεριοικογένεια *Aphidoidea* στη σειρά *Sternorrhyncha* της τάξης *Homoptera*, στην οποία έχουν περιγραφεί περίπου 4000 είδη. Ο μεγαλύτερος αριθμός ειδών αφίδων απαντάται στις εύκρατες περιοχές και εκεί το 25% των φυτικών ειδών προσβάλλονται από αφίδες. Υπάρχουν για σχεδόν 280 εκατομμύρια χρόνια και από την αρχή είχαν μικρό μέγεθος και αναπαράγονταν παρθενογενετικά (Dixon 1998).

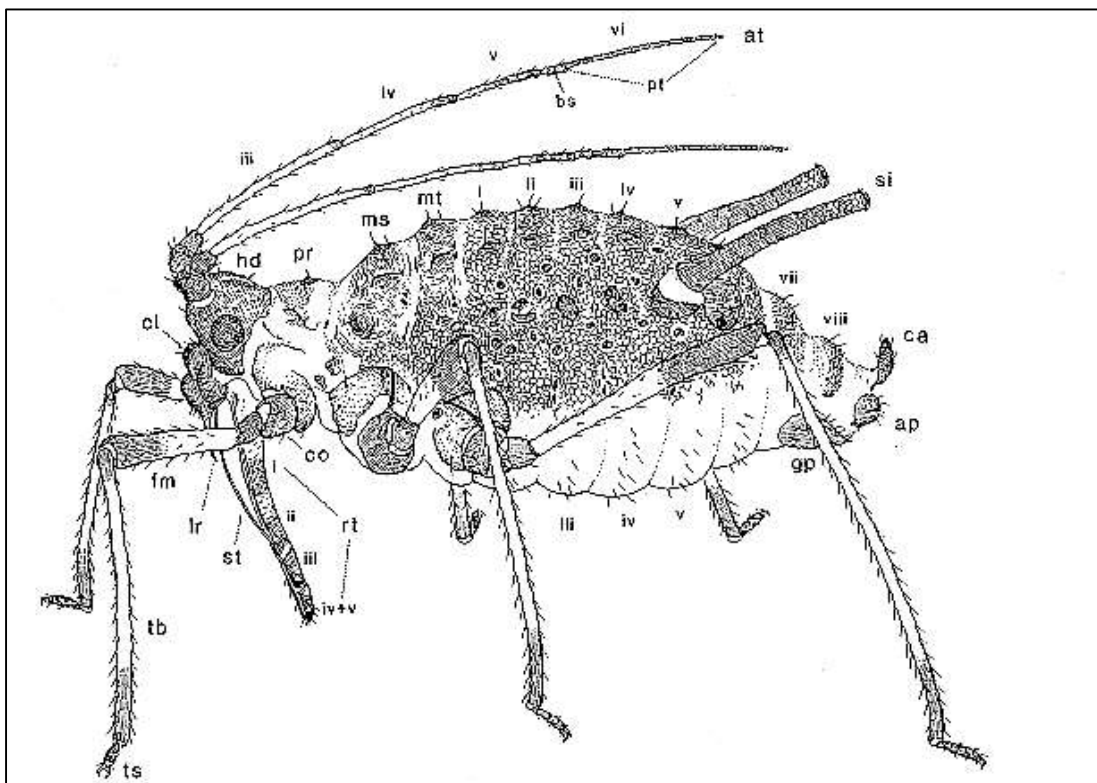
Είναι μικρόσωμα έντομα μήκους συνήθως 1-7 mm. Έχουν συνήθως μακριά πόδια με διάρθρους ταρσούς, μακρύ ρύγχος και κεραίες που αποτελούνται από ένα έως έξι άρθρα. Το σώμα τους είναι συνήθως μαλακό. Οι πτερωτές μορφές έχουν δύο ζεύγη διαφανών πτερύγων. Τα περισσότερα είδη είναι πολυμορφικά. Εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της υπεριοικογένειας στην οποία ανήκουν, οι πιο πολλές αφίδες έχουν στο νωτιαίο τεργίτη του 5ου κοιλιακού δακτυλίου ένα ζεύγος σωληνόμορφων αποφύσεων, που ονομάζονται σιφώνια ή κεράτια (*siphunculi*) και στην άκρη της κοιλιάς μια απόφυση που λέγεται ουρίτσα ή ουρά (*cauda*). Ρόλος των σιφωνίων είναι η απελευθέρωση φερομόνης συναγερμού όταν προσβληθεί ή εκτεθεί σε κίνδυνο η αφίδα από κάποιο εχθρό, προκαλώντας τη διασπορά των υπολοίπων αφίδων που βρίσκονται πλησίον της (Dixon 1998).

Ζουν κυρίως σε τρυφερούς βλαστούς και τρυφερά φύλλα διαφόρων φυτών. Μερικά είδη είναι ριζόβια (προσβάλουν τις ρίζες) ή φυλλόβια και ριζόβια (προσβάλουν φύλλα και ρίζες) και αρκετά είναι κηκιδόβια (ζουν μέσα σε κηκίδες που δημιουργούνται στο φύλλωμα των φυτών ξενιστών τους, όπου τρέφονται π.χ. το *Pemphigusbetae* Doane (*Hemiptera: Aphididae*)). Ζουν συνήθως σε ομάδες το ένα κοντά στο άλλο με την κεφαλή συνήθως προς τη βάση του βλαστού ή του φύλλου. Πολλά είδη δημιουργούν πυκνές αποικίες και την άνοιξη μπορεί να καλύψουν ολόκληρο το κορυφαίο μέρος των νέων βλαστών ορισμένων φυτών. Είναι έντομα στρατηγικής "r" γι' αυτό αποικίζουν γρήγορα και αποτελεσματικά τους ξενιστές τους. Τα θηλυκά των παρθενογενετικών γενεών είναι στις περισσότερες αφίδες ζωοτόκα, ενώ της γενιάς που αναπαράγεται εγγενώς είναι ωοτόκα.

Οι αφίδες είναι μυζητικά έντομα και τρέφονται σχεδόν συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Αφαιρούν μεγάλη ποσότητα χυμού από τα φυτά και το νύγμα πολλών ειδών προκαλεί συστρόφη των φύλλων. Τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα ορισμένων ειδών ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την ανάπτυξη καπνιάς, που δημιουργείται

από ανάπτυξη σαπροφυτικών μυκήτων. Σε πολλά είδη έχουν αναπτυχθεί σχέσεις συμβίωσης με μυρμήγκια, τα οποία συλλέγουν τα μελιτώδη απεκκρίματα προστατεύοντας τις αφίδες από διάφορους εχθρούς (Dixon 1973).

Σχήμα 1.1 Πλευρική όψη άπτερου παρθενογενετικού θηλυκού του *Macromyzus woodwardiae* (Takahashii) (τροποποιημένο από Miyazaki 1987b). ap: εδρική πλάκα, at: κεραία, bs: βασικό τμήμα του τελευταίου άρθρου της κεραίας, ca: ουρίτσα, cl: επιστόμιο co: ισχύον, fm: μηρός, gp: γενετική πλάκα, hd: κεφαλή, lr: χείλος ms: μεσοθώρακας, mt: μεταθώρακας, pr: προθώρακας, pt: τελικό τμήμα του τελευταίου άρθρου της κεραίας, rt: ρύγχος, si:σιφώνια, st: στιλέτα, tb: κνήμη, ts: ταρσός . Οι Λατινικοί αριθμοί υποδηλώνουν τον αριθμό του άρθρου.



Οι αφίδες είναι από τις κυριότερες κατηγορίες εντόμων που μεταδίδουν στα φυτά παθογόνους ιούς. Ορισμένα είδη είναι φορείς πολλών ιών και προκαλούν σοβαρές ζημιές στα καλλιεργούμενα φυτά. Οι πυκνοί συνήθως πληθυσμοί τους, ο μεγάλος αριθμός γενεών το έτος, που συχνά ξεπερνά τις 10 και η μετάδοση ιών στα φυτά κατατάσσουν τις αφίδες ανάμεσα στους πιο βλαβερούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών.

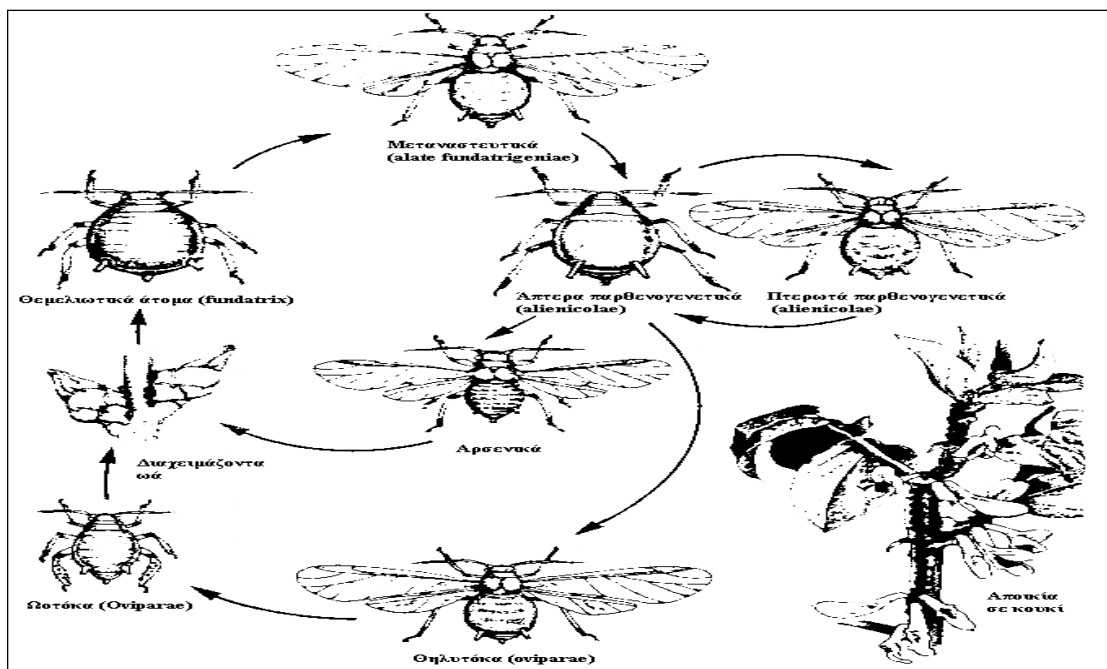
Οι αφίδες είναι άφθονες, κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο, και γενικά σε μετρίως θερμό και υγρό καιρό. Την άνοιξη τα παρθενογενετικά θηλυκά αναπαράγονται ταχύτατα γιατί οι συγκεκριμένες καιρικές συνθήκες και τα άφθονα τρυφερά φύλλα και βλαστοί ευνοούν την ανάπτυξή τους. Σε κλίματα όπως της Ελλάδας, οι θερμοί και ξηροί μήνες του καλοκαιριού δεν ευνοούν τη συνεχή αναπαραγωγή των αφίδων και οι πληθυσμοί τους τότε περιορίζονται σημαντικά. Στην Ελλάδα το μέγιστο του αριθμού των ειδών αφίδων όπως και των πληθυσμών τους παρατηρείται κατά το μήνα Μάιο (Τσιτσιπής *etal.* 1998). Οι αφίδες έχουν ένα μεγάλο αριθμό φυσικών εχθρών που συμβάλλουν στον έλεγχο των πληθυσμών τους. Μεταξύ των φυσικών εχθρών τους οι σπουδαιότεροι είναι έντομα. Μεταξύ αυτών υπάρχουν είδη Διπτέρων (*Syrphidae*, *Cecidomyiidae*), Νευροπτέρων (*Chrysopidae*, *Hemerobiidae*), Κολεοπτέρων (*Coccinellidae*, *Carabidae*, *Staphyllinidae*), Υμενοπτέρων (*Proctotrupidae*, *Chalcididae*, *Braconidae*, *Aphidiidae*). Επιπλέον υπάρχουν είδη που ανήκουν στα αραχνοειδή καθώς και σε *taxa* μυκήτων, όπως είδη των γενών *Empusa*, *Entomophthora* και *Verticillium*.

1.1 Η βιολογία της αφίδας

Στα ετερόοικα (μεταναστευτικά) είδη αφίδων τα ωά γεννιούνται στον φλοιό του κορμού του κύριου ξενιστή το φθινόπωρο. Η εκκόλαψη των ωών γίνεται την άνοιξη και προκύπτουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, που λέγονται θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα (*fundatrix*). Τα άπτερα αναπαράγονται παρθενογενετικά και τα άτομα επακόλουθων παρθενογενετικών γενεών παρουσιάζουν προοδευτικές μορφολογικές μεταβολές (Lees 1966). Μετά από ένα αριθμό γενεών γεννιούνται τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (*alataefundatrigeniae*), που διασκορπίζονται σε φυτά που ανήκουν στο ίδιο είδος με τον κύριο ξενιστή, ή μεταναστεύουν σε δευτερεύοντες ποώδεις ξενιστές. Εκεί, την άνοιξη και το καλοκαίρι, η μια παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Όμως, εκτός από άπτερες μορφές παράγονται και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (*alataealienicolae*) που μεταναστεύουν σε άλλα φυτά κι εκεί συνεχίζουν την παρθενογενετική αναπαραγωγή. Στα *Aphididae* παράγονται στο δευτερεύοντα ξενιστή πτερωτά θηλυτόκα (*gynoparae*) και αρσενικά κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου. Αυτά θα μεταναστεύσουν στον κύριο ξενιστή όπου τα θηλυτόκα θα γεννήσουν τα έμφυλα ωοτόκα θηλυκά (*oviparae*), τα οποία συζευγνύονται με τα αρσενικά και εναποθέτουν τα χειμερινά ωά. Στα ετερόοικα είδη παράγεται στους δευτερεύοντες ξενιστές μόνο μια μεταναστευτική μορφή, τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, που λέγονται φυλογόνα (*sexuparae*). Αυτά γεννούν στον πρωτεύοντα ξενιστή άπτερα αρσενικά και έμφυλα ωοτόκα θηλυκά. Τα θηλυκά που επιστρέφουν στον πρωτεύοντα ξενιστή πολλές φορές παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές από αυτά που μεταναστεύουν την άνοιξη στους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman&Eastop 2000).

Στα μονόοικα (μη μεταναστευτικές αφίδες) είδη, π.χ. *Aphisrumicis*L. (*Hemiptera: Aphididae*) ο ετήσιος κύκλος πραγματοποιείται στο ίδιο φυτό ή σε φυτά του ίδιου είδους. Το φθινόπωρο άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά (φυλογόνα) θα γεννήσουν ωοτόκα και αρσενικά που είναι συνήθως άπτερα αφού δε χρειάζεται να μεταναστεύσουν για να συμπληρωθεί ο βιολογικός τους κύκλος. Τα περισσότερα μονόοικα είδη σε ποώδη φυτά πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν μέσα από την ετεροοικία ενώ αρκετά από αυτά παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με ετερόοικα είδη που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο ποώδες φυτό ως δευτερεύοντα ξενιστή (Dixon 1998).

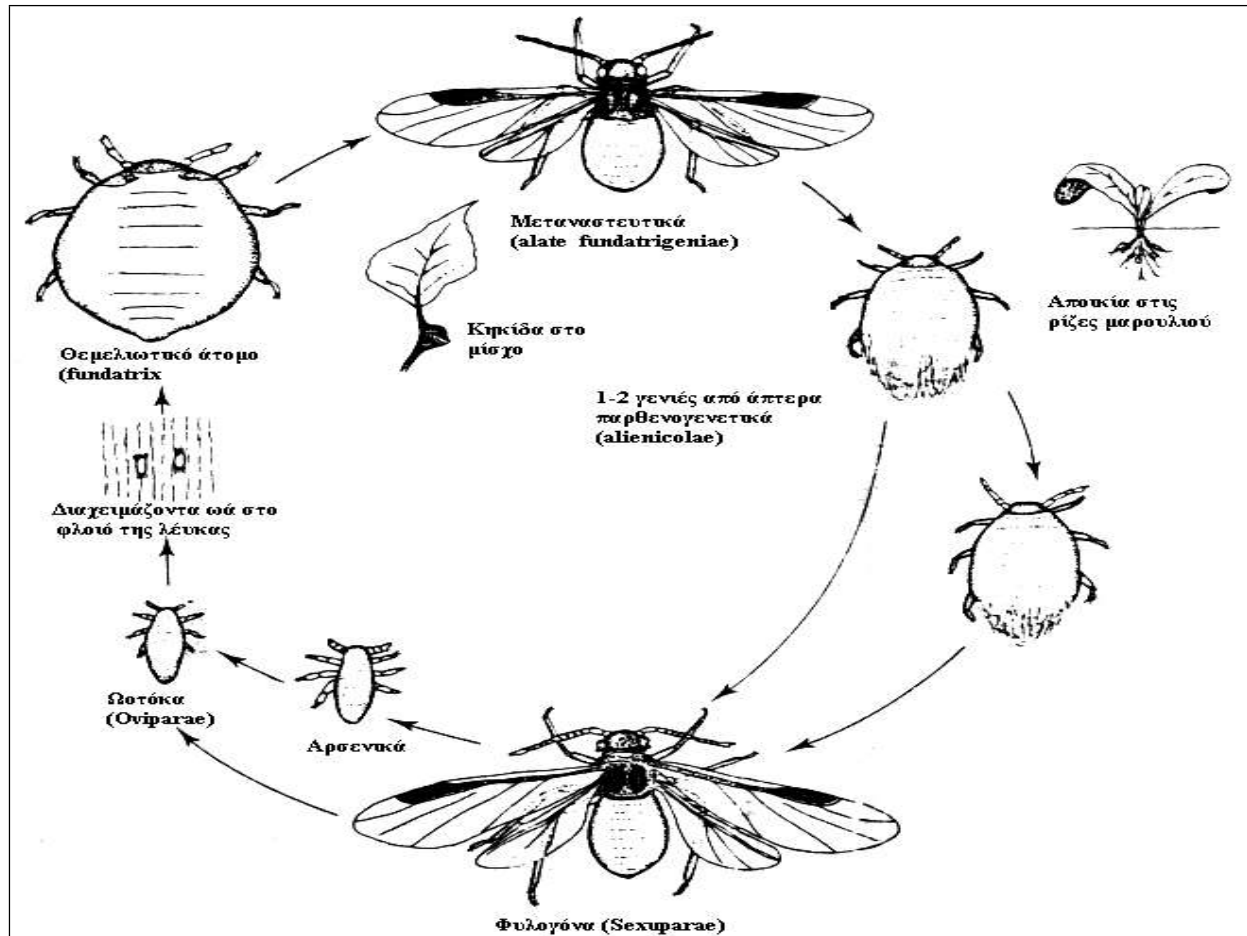
Σχήμα 1.1.1 Βιολογικός κύκλος του ετερόοικου είδους *Aphisfabae*Scopoli (Τροποποιημένο από Blackman&Eastop1984).



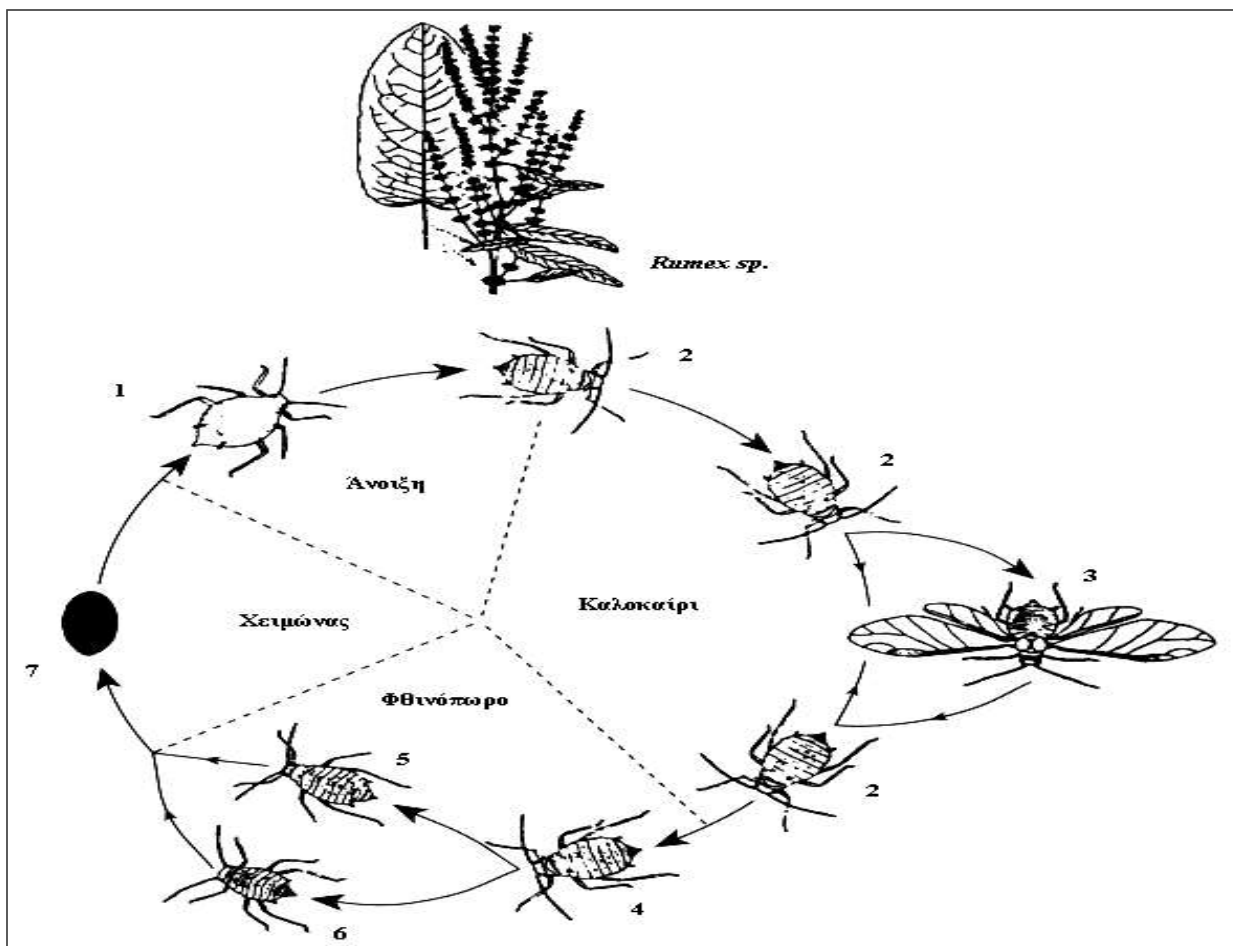
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αφίδων είναι η τηλεσκοπική ανάπτυξη των γενεών, συνδυασμένη με την ζωοτοκία, δηλαδή η ανάπτυξη του εμβρύου αρχίζει πριν ακόμη γεννηθεί η μητέρα του, ενώ με την ενηλικίωσή της το έντομο είναι έτοιμο να γεννηθεί. Η τηλεσκοπική παραγωγή, που συντομεύει τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου σε συνδυασμό με τη ζωοτοκία επιτρέπει την ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών, ενώ παράλληλα οδηγεί στη μείωση της μέσης

διάρκειας γενιάς των αφίδων, με αποτέλεσμα τη γρήγορη αύξηση των πληθυσμών τους. Επίσης, αυτό το χαρακτηριστικό έχει ως αποτέλεσμα οι αφίδες να συμπληρώνουν την ανάπτυξη τους σε χρόνο τρεις φορές μικρότερο από άλλα ισομεγέθη έντομα και οι πληθυσμοί τους να επιτυγχάνουν ρυθμούς αύξησης όμοιους με αυτούς μικρότερων ζώων, όπως π.χ. τα ακάρεα (Dixon 1998).

Σχήμα 1.1.2 Βιολογικός κύκλος του ετερόοικου είδους *Pemphigusbursarius*(L.) (τροποποιημένο από Blackman1975a).



Σχήμα 1.1.3 Βιολογικός κύκλος μονόοικου είδους *Aphisrumicis* L. 1. Θεμελιωτικό άτομο, 2. άπτερο παρθενογενετικό θηλυκό, 3. Πτερωτό παρθενογενετικό θηλυκό. 4. Φυλογόνο, 5. Ωοτόκο, 6. Αρσενικό, 7. Διαχειμάζον ωό



Συχνά, κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου των αφίδων εμφανίζεται το φαινόμενο της ανολοκυκλικότητας, δηλαδή έλλειψη της ικανότητας για σεξουαλική αναπαραγωγή. Έχουν βρεθεί είδη αφίδων, που είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά και αναπαράγονται όλο το χρόνο παρθενογενετικά. Επιπλέον, υπάρχουν είδη μερικώς ανολοκυκλικά. Στα μερικώς ανολοκυκλικά είδη οι ανολοκυκλικοί γενότυποι είτε βρίσκονται στην ίδια περιοχή μαζί με ολοκυκλικούς, είτε σε άλλες περιοχές του εύρους εξάπλωσης του είδους (Blackman&Eastop 2000). Αν και οι

ανολοκυκλικοί γενότυποι έχουν την ικανότητα να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, να αποικίσουν ανθεκτικές ποικιλίες και να παρουσιάσουν υψηλότερο ρυθμό αύξησης από ότι οι αντιστοιχοι ολοκυκλικοί, μόνο το 3% των ειδών είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά (Blackman 1980). Από την άλλη πλευρά, φαίνεται, ότι η σεξουαλική αναπαραγωγή προσδίδει σημαντικές δυνατότητες προσαρμογής και επιβίωσης στις αφίδες. Ανεξάρτητα από τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του ενός ή του άλλου τρόπου αναπαραγωγής, φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός που παρουσιάζουν διάφορα είδη αφίδων προσδίδει σε αυτές μια μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης, καθώς μπορούν και προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα και να αξιοποιούν περισσότερους πόρους.

Ταξινόμική θέση: Το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) ανήκει στο Ζωικό Βασίλειο, στην κλάση: *Insecta*, υπόκλαση: Εξωπτερυγωτά, τάξη: Homoptera, υπεροικογένεια Aphidoidea, και οικογένεια Aphididae. Υπάρχουν περισσότερα από 30 συνώνυμα ονόματα του είδους, που παρατίθενται στον Πίνακα 1. Το κοινό όνομα του *M. persicae* είναι πράσινη αφίδα της ροδακινιάς.

Περιγραφή: Το άπτερο ενήλικο παρθενογενετικό θηλυκό του *M. persicae* έχει σώμα σχετικά λεπτό με μικρό ως μέτριο μέγεθος. Το μέγεθος στα άπτερα και πτερωτά θηλυκά κυμαίνεται από 1,2 έως 2,3 mm. Το άπτερο έχει ομοιόμορφο χρωματισμό με διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του κόκκινου (πράσινο, ανοικτό κιτρινοπράσινο, πρασινοκίτρινο, κίτρινο, κόκκινο ή ρόδινο). Τα πτερωτά θηλυκά είναι πράσινου χρώματος και φέρουν μια μαύρη περιοχή επί του νωτιαίου μέρους της κοιλιάς. Τα ενήλικα ωτόκα θηλυκά έχουν συνήθως πορφυρό κόκκινο χρώμα (πιο σκούρα απόχρωση στους κόκκινους κλώνους) και διακρίνεται ένα σκούρο τμήμα στη ραχιαία περιοχή της κοιλιάς. Τα αρσενικά είναι κίτρινου χρώματος. Στα θηλυτόκα των πράσινων κλώνων, τα ανήλικα στάδια έχουν πράσινη απόχρωση, που συνήθως προοδευτικά γίνεται ρόδινη. Στους κόκκινους ή ρόδινους κλώνους το χρώμα παραμένει το ίδιο.

Ξενιστές: Είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών, σε όλες τις ηπείρους. Από τα καλλιεργούμενα προσβάλλει είδη των οικογενειών *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Malvaceae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae*, *Umbelliferae*, *Papilionaceae*, *Cruciferae*. Μερικές από τις καλλιεργείες που προσβάλλει είναι: καπνός, πατάτα, τομάτα, μαρούλι, καρότο, κουκιά, τεύτλα, σπανάκι, λάχανο κ.α. Τα χειμερινά αυγά γεννιούνται κυρίως στη ροδακινιά *Prunus persica* L. και μερικές φορές σε άλλα πυρηνόκαρπα (*P. nigra*, *P. tanella*, *P. serotina* και υβρίδια ροδακινιάς και αμυγδαλιάς).

Γεωγραφική εξάπλωση: Πιθανώς προέρχεται από την Ασία όπως και ο πρωτεύων ξενιστής του η ροδακινιά. Σήμερα έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους.

Βιολογία: Έχει περισσότερες από πέντε γενεές το έτος. Σε περιοχές με σχετικά ψυχρό χειμώνα το είδος διαχειμάζει ως χειμερινό ωό στο φλοιό των κύριων ξενιστών (ροδακινιάς ή άλλων πυρηνοκάρπων). Τα χειμερινά ωά, συνήθως 4-6 ανά θηλυκό, βρίσκονται στους οφθαλμούς ή

σε εσοχές αδρών μερών του φλοιού. Στο τέλος του χειμώνα με αρχές ανοίξεως τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά τα λεγόμενα θεμελιωτικά. Ακολουθεί μικρός αριθμός παρθενογενετικών γενεών στη ροδακινιά και έπειτα πτερωτά άτομα μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά (δευτερεύοντες ξενιστές), όπου η μία παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Το φθινόπωρο παράγονται στα ποώδη φυτά πτερωτά θηλυτόκα και αρσενικά τα οποία μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα γεννούν τα ωοτόκα, τα οποία εναποθέτουν τα χειμερινά ωά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Σε περιοχές με σχετικά ζεστό χειμώνα το έντομο αναπαράγεται παρθενογενετικά όλες τις εποχές του έτους. Επίσης υπάρχουν γενότυποι που χρησιμοποιούν και τις δυο στρατηγικές διαχείμασης. Το φθινόπωρο οι ανδροκυκλικοί κλώνοι παράγουν παρθενογενετικές μορφές, που θα διαχειμάσουν σε αυτοφυή φυτά ή χειμερινές καλλιέργειες και αρσενικά που συμμετέχουν στη σεξουαλική φάση του είδους (Müller 1954, 1958, Waldhauer 1953, 1957, vanEmdenetal. 1969, Blackman 1971, 1974). Οι ενδιάμεσοι κλώνοι γεννούν την ίδια εποχή πολλά άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και λίγα αρσενικά και «ενδιάμεσα» πτερωτά. Τα «ενδιάμεσα» πτερωτά παράγουν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και αριθμό ωοτόκων θηλυκών (Blackman 1971, 1972).

Ο χρωμοσωμικός αριθμός του είδους είναι $n=12$. Έχει βρεθεί μια A1, 3 χρωμοσωμική μετατόπιση που συνδέεται με το E4 μηχανισμό ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα βασιζόμενο στην εστεράση (Blackman&Takada 1975). Η χρωμοσωμική μετατόπιση παρουσιάζει ευρεία διάδοση σε όλο τον κόσμο (Blackmanetal. 1978) και εμφανίζεται κυρίως στην κόκκινη μορφή του είδους ενώ στην πράσινη εμφανίζεται περιστασιακά (Blackman 1987). Επίσης ο E4 μηχανισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, βασιζόμενος στην εστεράση, συνδέεται με τον ανολοκυκλικό τρόπο αναπαραγωγής ενώ ο EF4, όμοιας δράσης μηχανισμός που παρατηρείται στο είδος, συνδέεται με τον ολοκυκλικό τρόπο αναπαραγωγής. Πρόσφατα στην Ελλάδα έχουν βρεθεί κλώνοι που παρουσιάζουν και τους δυο μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Blackmanetal. 1999).

Το είδος είναι ανθεκτικό στο κρύο και μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 5oC και 30oC. Στους 25oC τα θηλυκά ζουν κατά μέσο όρο 25 ημέρες και γεννούν 60 νύμφες (Rivnay 1962).

Ζημιές: Προσβάλλει κατά προτίμηση τις κορυφές τρυφερών βλαστών και τρυφερά φύλλα, που συστρέφονται από την προσβολή. Επίσης τα μελιτώδη απεκκρίματα του ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς. Εκτός από την αξιολογή άμεση ζημιά που προκαλεί στα φυτά, θεωρείται ο πιο σοβαρός φορέας ιών, αφού μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά περισσότερους από 100 ιούς φυτών (Kennedyetal. 1962). Μερικοί από τους έμμοιους ιούς που μεταδίδει είναι ο ιός του ήπιου κιτρινίσματος των τεύτλων (BMY), της παραμόρφωσης των νεύρων του καπνού (TVD), του καρουλιάσματος των φύλλων του μπιζελιού (PLR) και του καρουλιάσματος τωνφύλλων της πατάτας (PLRV) (Blackman&Eastop 1984). Επίσης το είδος μεταδίδει

αποτελεσματικά και πολλούς μη έμμονους ιούς. Μερικοί από τους οποίους είναι: ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV), ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), ο ιός της κίτρινης στιγμάτωσης της κολοκυθιάς (ZYMV), ο ιός του Y της πατάτας (PVY), ο ιός του A της πατάτας (PVA), ο ιός του μωσαϊκού της μηδικής (AMV) (Bruntetal. 1996).

1.2 Εξειδίκευση Αφίδων

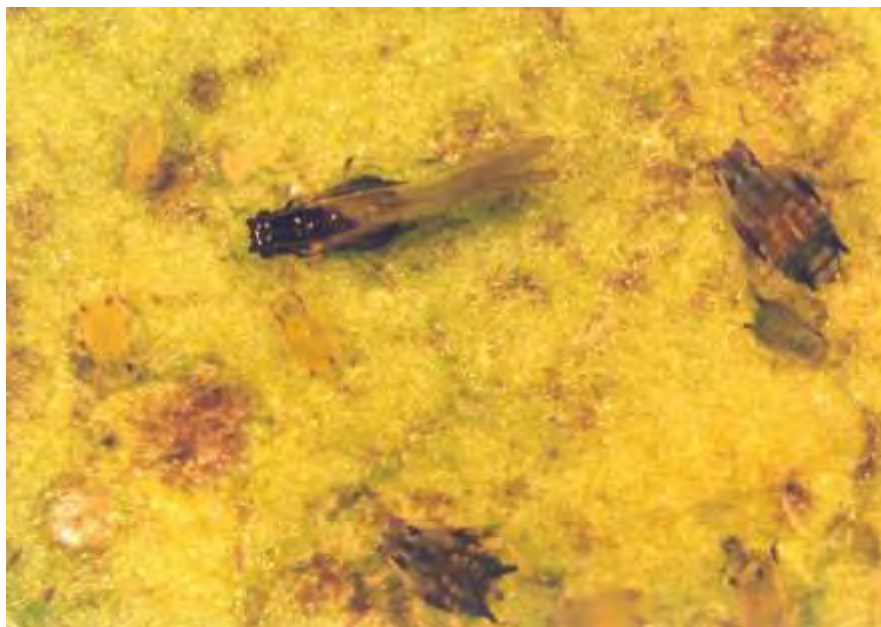
Ένας μεγάλος αριθμός ειδών αφίδων είναι εξειδικευμένος σε ένα φυτό ξενιστή και ορισμένα είδη, που είναι οικονομικά σημαντικά, είναι εξαιρετικά πολυφάγα. Η ανάπτυξη φυλών προσαρμοσμένων σε ένα ξενιστή είναι μια διαδικασία φυσικής επιλογής όπου, νέοι πληθυσμοί αφίδων ξεπερνούν τους μηχανισμούς αντίστασης των φυτών και προσαρμόζονται σε συγκεκριμένα φυτά ξενιστές.

Οι προσαρμοσμένες φυλές σε ξενιστή στις αφίδες είναι γνωστές για πάνω από 150 χρόνια (Walker 1850) και σχεδόν τα μισά είδη εντόμων από τα 36 που έχουν μελετηθεί και έχουν φυλές, είναι αφίδες (Tomiuk 1990).

Για παράδειγμα, η αφίδα του μπιζελιού *Aphis pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), έχει δύο φυλές. Οι πληθυσμοί της είναι απομονωμένοι λόγω της εξειδίκευσής τους στο τριφύλλι (*Trifolium pratense* L. (Fabaceae)) και τη μηδική (*Medicago sativa* L. (Fabaceae)). Η προσαρμογή σε κάθε ξενιστή φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της συμπεριφοράς κατά την επιλογή ξενιστή. Βρέθηκε συσχέτιση με αλληλοχημικές ουσίες κάθε ξενιστή που διεγείρουν τη διατροφή και την εναπόθεση την νυμφών (Caillaud 1999).

Η αφίδα *A. gossypii* γενικά είναι πολυφάγο είδος με γενότυπους που διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να αναπαράγονται σεξουαλικά και την προτίμηση ξενιστή. Μελέτη που έγινε από τους Gulderson et al. (1994) έδειξε ότι γενότυποι που συλλέχθηκαν στο χρυσάνθεμο (*Dendranthemagrandiflora* Tzvelev. (Asteraceae)) και αγγούρι (*Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae)) αποτελούν διαφορετικές φυλές. Παρατηρήθηκε πολύ χαμηλό ποσοστό αναπαραγωγής όταν παρθενογενετικές σειρές από χρυσάνθεμο αναπτύσσονταν σε αγγούρι και το αντίστροφο.

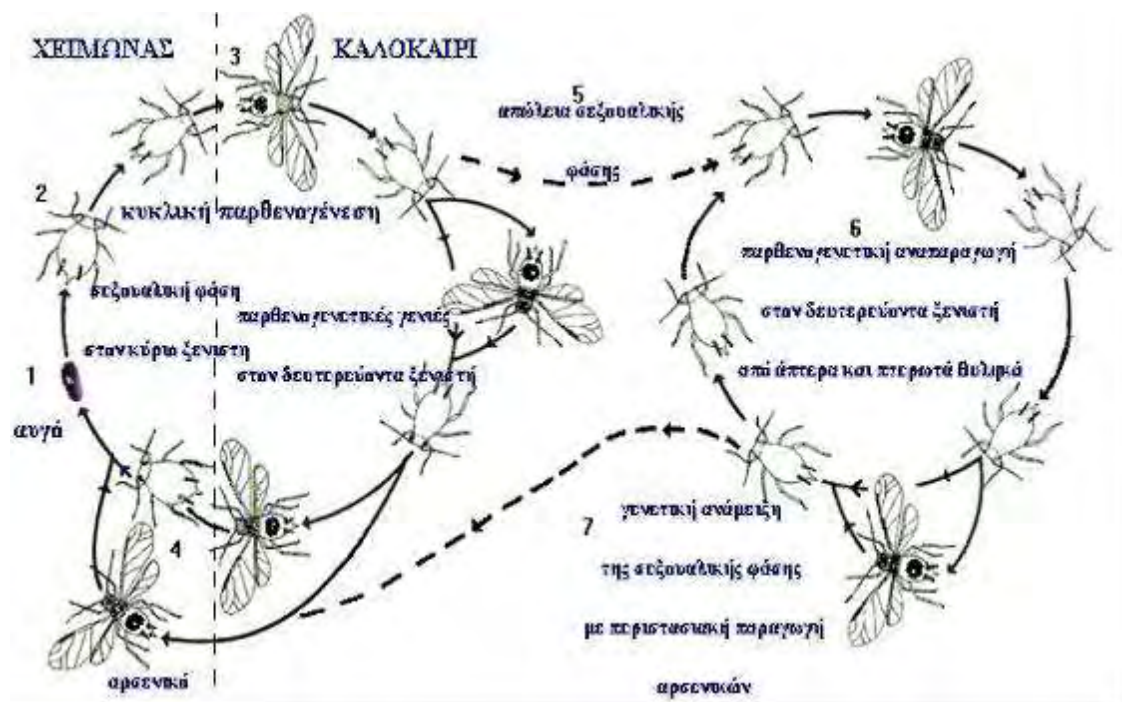
Εικόνα 1.2.1 Αφίδα *Aphisgossypii*, **α**: άπτερες μορφές (apterae) και **β**: πτερωτά (alatae) και πτερωτές νύμφες (alatiformnymphs).



Η αφίδα *Therioaphis trifolii* (Monell) (Hemiptera: Aphididae) έχει φυλές προσαρμοσμένες στη μηδική και στο τριφύλλι (*Trifolium subterraneum* L. (Fabaceae)). Οι Sunnuckset al. (1997), σύγκριναν δείγματα του *T. trifolii* από τριφύλλι και μηδική. Χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές μελέτησαν την επιβίωση και αναπαραγωγή σε διαφορετικούς ξενιστές, τη μορφολογία, το προφίλ υδρογονανθράκων της επιδερμίδας των αφίδων, τον καρυότυπο, ενώ παράλληλα χρησιμοποίησαν και μοριακές μεθόδους (RAPD-PCR, μιτοχονδριακό DNA). Μορφολογικές και γενετικές διαφορές βρέθηκαν, ως προς τον ξενιστή που συλλέχθηκαν οι αφίδες. Η ύπαρξη των γενετικών διαφορών απέδειξε ότι οι πληθυσμοί από τους διαφορετικούς ξενιστές αποτελούν διαφορετικές φυλές.

Επίσης φυλές προσαρμοσμένες σε ένα ξενιστή έχουν βρεθεί στα είδη *Schizaphis graminum* Rondani, *Amphorophora rubi* και *Cryptomyzus galeopsidis* (Kalt) (Hemiptera: Aphididae) (Guldmond 1990a).

Εικόνα 1.2.2 Εναλλαγή ξενιστών και μορφές του *M. Persicae* (Τροποποιημένο από Field & Blackman, 2003)



Η αφίδα *Myzus persicae* είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος, εξαιρετικά πολυφάγο. Έχει μεγάλη ικανότητα μετάδοσης φυτικών ιών και αρκετούς γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με το χρώμα, το βιολογικό της κύκλο, τη σχέση φυτού-ξενιστή και τις μεθόδους ανθεκτικότητας.

στα εντομοκτόνα. Ενήλικα άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά της αφίδας *M. persicae* έχουν μικρό προς μεσαίο σώμα που κυμαίνεται από 1,2 έως 2,3 mm. Το άπτερο έχει ομοιόμορφο χρωματισμό με διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του κόκκινου (πράσινο, ανοικτό κιτρινοπράσινο, πρασινοκίτρινο, κίτρινο, κόκκινο ή ρόδινο). Τα περωτά θηλυκά είναι πράσινου χρώματος και φέρουν μια μαύρη περιοχή επί του νωτιαίου μέρους της κοιλιάς. Τα ενήλικα ωτόκα θηλυκά έχουν συνήθως πορφυρό κόκκινο χρώμα (πιο σκούρα απόχρωση στους κόκκινους κλώνους) και διακρίνεται ένα σκούρο τμήμα στη ραχιαία περιοχή της κοιλιάς. Τα αρσενικά είναι κίτρινου χρώματος ή κιτρινοπράσινου. Στα θηλυτόκα των πράσινων κλώνων, τα ανήλικα στάδια έχουν πράσινη απόχρωση, που συνήθως προοδευτικά γίνεται ρόδινη. Στους κόκκινους ή ρόδινους κλώνους το χρώμα παραμένει το ίδιο. (Blackman&Eastop2007)

Η σεξουαλική φάση της αφίδας *M. persicae* λαμβάνει χώρα κυρίως στη ροδακινιά *Prunuspersicae* (συμπεριλαμβάνοντας και τη νεκταρινιά *Prunuspersicae* nectarina), εκτός από μέρη στην βορειοανατολική Αμερική και περιοχές στον ανατολικό Καναδά, όπου το *Prunusnigra* είναι ο κύριος πρωτεύων ξενιστής (Shandsetal. 1969). Εναλλαγή ξενιστών συμβαίνει στις εύκρατες περιοχές σε όλες τις ηπείρους, οπουδήποτε υπάρχουν ροδακινιές και οι φθινοπωρινές θερμοκρασίες είναι τόσο χαμηλές, ώστε να επιτρέψουν την παραγωγή των σεξουαλικών μορφών (Blackman 1974). Ο πληθυσμός της αφίδας την άνοιξη στη ροδακινιά γίνεται πολύ πυκνός, όπου ακολουθεί κολούριασμα των φύλλων. Σε αντίθεση με τον εξαιρετικά ειδικευμένο πρωτεύοντα ξενιστή, ο δευτερεύων ξενιστής μπορεί να ανήκει σε περισσότερες από 40 οικογένειες φυτών. Οι οικογένειες αυτές περιλαμβάνουν πολλά οικονομικής σημασίας φυτά, όπου στα περισσότερα ο πληθυσμός τους διασκορπίζεται και αυξάνεται εύκολα ενώ μεμονωμένα άτομα μπορεί να βρεθούν σε γηραιότερα φύλλα. Σημαντική είναι και η ικανότητα της αφίδας *M. persicae* να μεταδίδει φυτικούς ιούς. Μεταδίδει περισσότερους από 100 ιούς, συμπεριλαμβανομένων των έμμονων: α) καρούλιασμα φύλλων πατάτας, β) αφιδομεταδιδόμενος ίκτερος κολοκυνθοειδών και γ) παραμόρφωση νεύρων καπνού.

Χαρακτηριστικό του *Myzuspersicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) είναι η προσαρμογή σε συγκεκριμένα φυτά ξενιστές. Οι πληθυσμοί που τρέφονται για παράδειγμα στον καπνό μπορούν να διαχωριστούν από αυτούς που προέρχονται από άλλους ξενιστές. Αυτό μπορεί να γίνει με τη μέθοδο της σωματομετρίας ή με τεχνικές ηλεκτροφόρησης (Blackman 1987, Blackman&Spence 1992, Margaritopoulosetal. 2000). Ο Blackman (1987) περιέγραψε τη μορφή που τρέφεται στον καπνό ως καινούριο είδος, το *Myzusnicotianae* Blackman (Hemiptera: Aphididae). Γινόταν αποδεκτό ότι οι συγκεκριμένοι πληθυσμοί ήταν κυρίως παρθενογενετικοί και συνεπώς δεν μπορούσαν να διασταυρωθούν με το *M. persicae*. Όμως, ο βιολογικός κύκλος του *M. nicotianae* παρουσιάζει πολυμορφισμό. Σε πολλές περιοχές που καλλιεργείται ο καπνός δεν έχει αναφερθεί σεξουαλική αναπαραγωγή. Αντίθετα, στην Ιαπωνία, στην Κεντρική Ασία και το Καζακστάν βρέθηκαν ανδροκυκλικοί πληθυσμοί του συμπλόκου *M. persicae* που τρέφονται σε καπνό. Στην Ελλάδα, παρθενογενετικές σειρές που τρέφονται σε καπνό βρέθηκαν να

μεταναστεύουν από τη ροδακινιά στον καπνό. Επίσης, στη Βόρεια Ελλάδα, στις κύριες περιοχές που καλλιεργείται η ροδακινιά, ένα πολύ υψηλό ποσοστό παρθενογενετικών σειρών που τρέφεται στον καπνό και άλλους ξενιστές έχουν την ικανότητα σεξουαλικής αναπαραγωγής (Margaritopoulos et al., 2002).

Σε μελέτη που έγινε, με τη μέθοδο της RAPD-PCR, χρησιμοποιήθηκαν 63 τυχαίοι primers, για να διαχωρίσουν παρθενογενετικές σειρές *M. persicae*, που προέρχονταν από τον καπνό και άλλα φυτά ξενιστές. Και οι 63 primers που χρησιμοποιήθηκαν απέτυχαν να ανιχνεύσουν κάποια σταθερή διαφορά στο πρότυπο ζωνών μεταξύ των ομάδων. Μόνο ένας primer (OPA-18) έδωσε ένα σημαντικό πολυμορφισμό σε σχέση με το φυτό ξενιστή. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν, ότι το *M. nicotianae* δεν πρέπει να θεωρείται διαφορετικό είδος από το *M. persicae*. Ωστόσο, οι αφίδες που αποικίζουν τον καπνό αποτελούν ξεχωριστή φυλή προσαρμοσμένη στο συγκεκριμένο ξενιστή (Margaritopoulos et al., 1998).

Οι αφίδες θεωρούνται ιδανικά έντομα για συμπατρική δημιουργία ειδών γιατί παρουσιάζουν: 1) εξειδίκευση ξενιστή, 2) μηχανισμό της κυκλικής παρθενογένεσης, 3) επαγωγή, 4) εναλλαγή ξενιστή, 5) παραγωγή σεξουαλικών θηλυκών και 6) παραγωγή άπτερων αρσενικών.

Παρουσιάζουν εξειδίκευση ξενιστή σε μεγάλο βαθμό ώστε το 99% όλων των ειδών να περιορίζονται σε ένα ή περισσότερα στενά συνδεδεμένα είδη φυτών (Eastop 1973), γεγονός που σχετίζεται με μια γενετικά καθορισμένη προτίμηση για ένα φυτό-ξενιστή καθώς και με υψηλή αναπαραγωγική δραστηριότητα (Guldemon 1990a, 1990b, MacKenzie 1996). Το γεγονός ότι κάθε παρθενογενετική σειρά συνήθως αποτελείται από πολλά μέλη καθένα από τα οποία έχει έναν υψηλό ενδογενή ρυθμό αύξησης προάγει την προσπάθεια για ανεύρεση ενός καλύτερου ξενιστή. Για παράδειγμα, αν σε ένα μη κατάλληλο ξενιστή παρατηρείται το ένα δέκατο της γονιμότητας σε σχέση με ένα προτιμώμενο, ο μη κατάλληλος ξενιστής πρέπει να είναι δέκα φορές πιο άφθονος για να μπορέσει να αντισταθμίσει τη διαφορά. Γι' αυτό το λόγο, παρά τις τεράστιες απώλειες που υπάρχουν κατά την ανεύρεση φυτών-ξενιστών, η εξειδίκευση δεν αποτελεί έλλειψη ικανότητας για προσαρμογή αλλά αποτελεί βέλτιστη στρατηγική για τις αφίδες (Kindlmann & Dixon 1994, Mackenzie & Guldemon 1994, Dixon 1994).

2. Εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα

Στις αρχές του 20ου αιώνα αρκετές ανόργανες ουσίες όπως αρσενικός μόλυβδος χρησιμοποιούνταν για την καταπολέμηση των εντόμων. Στη συνέχεια άρχισαν να χρησιμοποιούνται φυτικά εκχυλίσματα (*botanical insecticides*, *pyrethrum*, *nicotine*, *veratridine*, *rotenone*), που είχαν πιο εκλεκτική δράση σε σχέση με τα ανόργανα εντομοκτόνα με βάση τη χημική ταυτοποίηση δραστικών ουσιών των φυτικών εκχυλισμάτων, παρήχθησαν, σύμφωνα με τη χημεία και την καινοτομία στην οργανική σύνθεση, εκατοντάδες χημικές ουσίες, ορισμένες εκ των οποίων επιλέχθηκαν ε βάση τις ιδιότητές τους (αποτελεσματικότητα, εκλεκτικότητα, σταθερότητα, φαρακοκινητική), και κυριάρχησαν στην αγορά των εντομοκτόνων. Τα περισσότερα από αυτά τα εντομοκτόνα ήταν ευρέως φάσματος νευροτοξικά μόρια, όπως τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμικά και τα πυρεθρινοειδή. Αρκετά χρόνια αργότερα, αναπτύχθηκαν πιο εκλεκτικά αλλά και νευροτοξικά εντομοκτόνα, όπως τα νεονικοτινοειδή και οι σπινουσίνες. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1970, η έρευνα για την ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων, στράφηκε σε εξειδικευμένα φυσιολογικά μονοπάτια των εντόμων, όπως η μεταμόρφωση και η βιοσύνθεση της χιτίνης, και τα ευρήματα της έρευνας αυτής αξιοποιήθηκαν με τη δημιουργία ρυθμιστών ανάπτυξης (IGR μιμητές ορμονών νεότητας και παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της χιτίνης) πολύ χαμηλής τοξικότητας για τους οργανισμούς μη στόχους.

Η ανάπτυξη της ρομποτικής και της βιοτεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες επέτρεψε τη μαζική σάρωση *in vivo* κυτταροκαλλιιεργιών (εντόμων, σε σχέση με κύτταρα οργανισμών μη στόχων) με χιλιάδες ουσίες, φυσικής και χημικής προέλευσης, κατάλληλου μοριακού βάρους και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (λιπόφιλες) που είναι διαθέσιμες στις βιβλιοθήκες των μεγάλων εταιριών. Το γεγονός αυτό επέτρεψε την αναγνώριση δραστικών (*leads*) με σημαντική εξειδικευμένη δράση σε μικρές συγκεντρώσεις, που στη συνέχεια αξιολογήθηκαν στην αγορά των εντομοκτόνων.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν εισαχθεί επιπλέον κενότομες προσεγγίσεις στη σχετική έρευνα για την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ανάλυση και αξιολόγηση ουσιών που παράγονται από διάφορα φυτά ή μικροοργανισμούς (είτε φυσιολογικά, είτε μετά από στοχευμένο ή μή στρες, για ενεργοποίηση επιπλέον βιοσυνθετικών μονοπατιών). Επίσης, ο σχεδιασμός και η βελτίωση εντομοκτόνων με βάση τη κρυσταλλική δομή πρωτεϊνών στόχων των εντόμων (*in silico*, *protein-ligand interaction*), μοριακές τεχνικές RNAi και συγκριτικές γονιδιωματικές αναλύσεις που στοχεύουν στην ανεύρεση νέων ζωτικής σημασίας γονιδίων στόχων στα έντομα, που απουσιάζουν ή είναι πολύ διαφορετικά σε οργανισμούς μη στοχούς.

2.1 Δομή και κατανομή της παγκόσμιας αγοράς των εντομοκτόνων

Η παγκόσμια αγορά των εντομοκτόνων σήμερα ανέρχεται σε 17 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως, ποσό που αποτελεί περίπου το 25% του συνολικού κόστους της φυτοπροστασίας (ζιζανιοκτόνα 45%, μυκητοκτόνα 25%, λοιπά 5%).

Το μεγαλύτερο μέρος της αγοράς των εντομοκτόνων αφορά τα φρούτα και τα λαχανικά (28%) και στη συνέχεια το ρύζι (10,7%), το αμβάκι (10,2%), η σόγια (8,1%) και το καλαμπόκι (7,7%). Οι στόχοι τους είναι κυρίως λεπιδόπτερα (31%), μυζιτικά έντομα (30%), κολεόπτερα (10%) και ακάρεα (10%).

Πίνακας 2.1.1 Τρόπος δράσης μελλοντικών εντομοκτόνων που βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης

Κύριος στόχος δράσης	Χημική ομάδα	Παράδειγμα δρ. ουσίας	Έτος
GGCC allosteric	Isoxazolines	fluralaner	2010
GGCC allosteric	Isoxazolines	afoxolaner	2014
GGCC allosteric	Metadiamides	broflanilide	2013
nAChR agonist	Cycloxaprid	cycloxaprid	2011
nAChR	Mesoionics	triflumezopyrim	2013
Ry-R allosteric	Diamides	cyclaniliprole	2013
Ry-R allosteric	Diamides	tetraniliprole	2014
UN	Pyropenes	afidopyropen	2012
UN	Flometoquin	flometoquin	2011
UN	Fluhexafon	fluhexafon	2014

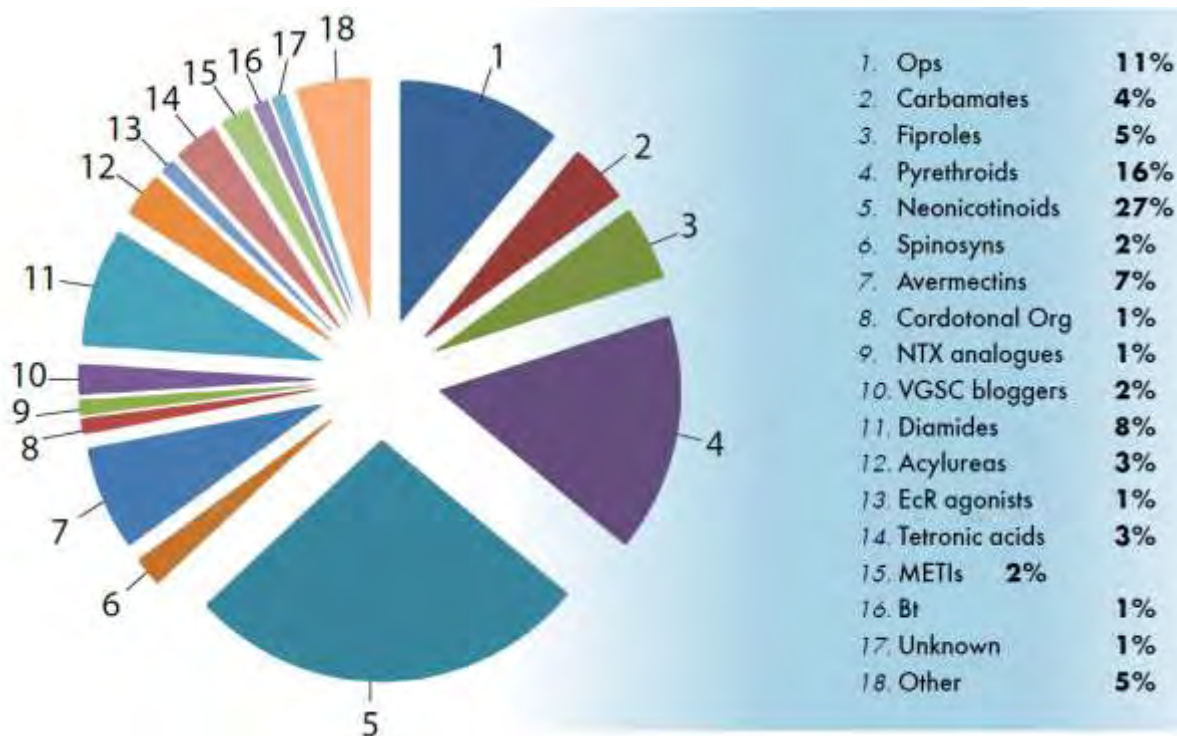
GGCC, GABA: διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά κανάλια μεταφοράς ιόντων χλωρίου και αγωνιστές του GABA, nAChR: νικοτινικοί νικοτινεργικοί υποδοχείς, Ry-R: ρυανοδίνη, UN: άγνωστος (unknown). Τροποποιημένο από Sparks&Nauen (2015)

Η κατανομή της αγοράς των εντομοκτόνων, με βάση το μηχανισμό δράσης και την κατηγοριοποίηση του IRAC εμφανίζεται στην εικόνα 2.1.1

Τα περισσότερα από αυτά (περίπου 80%), επιδρούν στο νευρικό σύστημα των εντόμων (οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά: ακετυλοχολινεστεράση, νεονικοτινοειδή: νικοτινεργικούς υποδοχείς, οργανοχλωριωμένα και πυρεθρινοειδή: διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά κανάλια μεταφοράς ιόντων νατρίου, αβερμεκτίνες: διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων χλωρίου και αγωνιστές του GABA).

Νέες δράσεις εντομοκτόνων αναφορικά με το μηχανισμό δράσης και τη χημική δομή τους, αναπτύχθηκαν πρόσφατα (πίνακας 2.1.2), και είναι σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης στην παγκόσμια αγορά (διαδικασία έγκρυσης κλπ.).

Πίνακας 2.1.2 Κατανομή παγκοσμίως πωλήσεων εντομοκτόνων (% συνολικής αξίας) σύμφωνα με την κατηγορία και την υποκατηγορία του IRACMoA. Συνολική αξία για το 2014 17.016 εκατομμύρια \$ (εκτός καπνιστικών σκευασμάτων). Τροποποιημένο από Sparks&Nauen



2.2 Νέα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα στην ελληνική αγορά

Η ανάπτυξη νέων προϊόντων στην ελληνική αγορά αφορά περισσότερο νέα βελτιωμένα σκευάσματα τα τελευταία χρόνια, παρά νέες δραστικές. Τα σκευάσματα περιέχουν παλιές δραστικές, συχνά σε νέες πιο εύχρηστες μορφές και με βελτιωμένη σύνθεση, όπως ενσωμάτωση συνεργιστών (παρεμποδιστές ενζύμων αποτοξικοποίησης για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας) που βελτιώνουν την αποτελεσματικότητά τους.

Αρκετές δραστικές που αναπτυχθηκαν την τελευταία πενταετία, έχουν επίσης έρθει ή αναμένεται να έρθουν στην ελληνική αγορά τα επόμενα χρόνια (πίνακας 2.2.1).

Πίνακας 2.2.1 Παραδείγματα νέων δραστικών/σκευασμάτων που αφορούν εχθρούς σημαντικών καλλιεργειών της Ελλάδας

Εμπορική ονομασία	Δραστική ουσία	Ομάδα (IRAC)	Τρόπος δράσης	Εχθρός
Affirm 095 SG	emamectin benzoate	Αβερμεκτίνες (6)	Παρεμποδιστής GABA	Λεπιδόπτερα (Πράσινο σκουλήκι, Σποντόπτερα, Πιερίδα, Ευδεμίδα, Tuta absoluta κ.α.)
Movenio 150 OD	spirotetramat	Παράγωγα τετραμικών οξέων (23)	Παρεμποδιστή βιοσύνθεσης λιπιδίων	Μυζητικά έντομα (Αλευρώδεις, Αφίδες, Ψευδόκοκκος, Ψώρες κ.α.)
Altacor 35 WG, Coragen 20 SC Ampligo 150 ZC (μείγμα) Luzindo 40 WG (μείγμα) Voliam Targo 063 SC (μείγμα)	chlorantraniliprole	Διαμίδια (28)	Ενεργοποίηση RyR	Λεπιδόπτερα (Πράσινο σκουλήκι, Σποντόπτερα, Πιερίδα, Ευδεμίδα, Tuta absoluta κ.α.)
Mn διαθέσιμο (Du Pont)	cyantraniliprole	Διαμίδια (28)	Ενεργοποίηση RyR	Λεπιδόπτερα, Μυζητικά έντομα, Θρίπες, Δίπτερα
Mn διαθέσιμο (Dow)	sulfoxaflor	Σουλφοξαμίνες (4C)	Παρεμποδιστής nAChR	Μυζητικά έντομα (Αλευρώδεις, Αφίδες κ.α.)
Mn διαθέσιμο (BAYER AG)	flupyradifurone	Butenolides	Mn διαθέσιμο	Μυζητικά έντομα (Αλευρώδεις, Αφίδες κ.α.)
Mn διαθέσιμο (Dow)	spinetoram	Σπινোসίνες (5)	Παρεμποδιστής nAChR	Λεπιδόπτερα, Θρίπες, Υπονομευτές φύλλων (δίπτερα)
Teppski 50 WG	flonicamid	Pyridinecarboxamide (9C)	Τροποποιητής χορδοτονικών οργάνων	Μυζητικά έντομα (Αλευρώδεις, Αφίδες)
Mn διαθέσιμο (Nissan Chemicals)	cyenopyrafen	METIs (beta-ketonitrile)	Complex II, succinate-CoQ reductase	Ακάρεα (τεράνυχος κ.α.)
Mn διαθέσιμο (Otsuka AgriTechno Co., Ltd)	cyflumetofen	METIs	Complex II	Ακάρεα (τεράνυχος κ.α.)

Παραδείγματα νέων εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων, διαφορετικών ομάδων, μηχανισμών και φασμάτων δράσης αναλύονται παρακάτω:

- Spirotetramat (Movento®, Bayer-Ελλάς): διασυστηματικό εντομοκτόνο, που ανήκει στα παράγωγα τετραμικών οξέων και κετοενολών, και δρα στη βιοσύνθεση των λιπιδίων (καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA). Έχει πάρει έγκριση σε πολλές καλλιέργειες για τον έλεγχο μυζητικών εντόμων όπως αλευρώδεις, αφίδα, ψευδόκοκκος κ.α.

- Cyantraniliprole (Cyazypyr®, DuPont®): νέο διασυστηματικό εντομοκτόνο, που ανήκει στα διαμίδια που δρουν στο μυϊκό σύστημα, στους υποδοχείς της ρυανοδίνης. Είναι ένα εντομοκτόνο ευρέως φάσματος, για μασητικά και μυζητικά έντομα, όπως αλευρώδεις, λεπιδόπτερα, θρίπες και δίπτερα, με ακμαιοκτόνο και προνυμφοκτόνο δράση.

- Emamectinbenzoate (Afrim®, SyngentaHellas): μη διασυστηματικό εντομοκτόνο που ανήκει στις αβερμεκτίνες, που στοχεύουν το κανάλι ιόντων χλωρίου και τους υποδοχείς του γ-αμινοβουτηρικού οξέως (GABA). Έχει πάρει έγκριση σε πολλές καλλιέργειες για τον έλεγχο λεπιδόπτερων, όπως πράσινο σκουλίκι, σποντόπτερα, περιδία, εθδεμίδα, καρπόκαψα, φυλλορύκτης της τομάτας κ.α.

- Sulfoxaflo® (Dow®): νέο διασυστηματικό εντομοκτόνο, που ανήκει στις σουλφοξαμίμες (sulfoximines), που δρουν στους μετασυναπτικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (ανταγωνιστικά), σε διαφορετικές θέσεις όμως από τα νικοτινοειδή. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μυζητικών εντόμων όπως αλευρώδεις, αφίδες κ.α. Έχει ακμαιοκτόνο και προνυμφοκτόνο δράση.

- Spinetoram (Dow®): νέο εντομοκτόνο, που ανήκει στην ομάδα των σπινোসινών που δρουν στους μετασυναπτικούς νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, σε διαφορετική θέση σε σχέση με άλλα εντομοκτόνα που δρουν στον ίδιο στόχο. Είναι κατάλληλο για τον έλεγχο μεγάλου εύρους εχθρών όπως λεπιδόπτερα, υπονομευτές φύλλων (δίπτερα) και θρίπες.

- Flupyradifurum (Sivanto®, Bayer-Ελλάς): είναι ένα νέο διασυστηματικό εντομοκτόνο, που ανήκει στην ομάδα butenolides. Ο μηχανισμός δράσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Είναι ένα εντομοκτόνο για τον έλεγχο μυζητικών εντόμων. Σε αλευρώδεις έχει κυρίως προνυμφοκτόνο δράση όμως σε εργαστηριακά πειράματα επέδειξε και ακμαιοκτόνο δράση.

- Flonicamid (Teppeki® - Ευθυμιάδη Κ. & Ν. ΑΒΕΕ): είναι ένα διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου που ανήκει στην ομάδα Pyridinecarboxamide. δρα ως τροποποιητής χοδροτονικών οργάνων των εντόμων και παρεμποδίζει τη διατροφική δραστηριότητα. Το flonicamid έχει προληπτική και κατασταλτική δράση για την αντιμετώπιση κυρίως μυζητικών, καθώς και ασητικών εντόμων σε διάφορες καλλιέργειες.

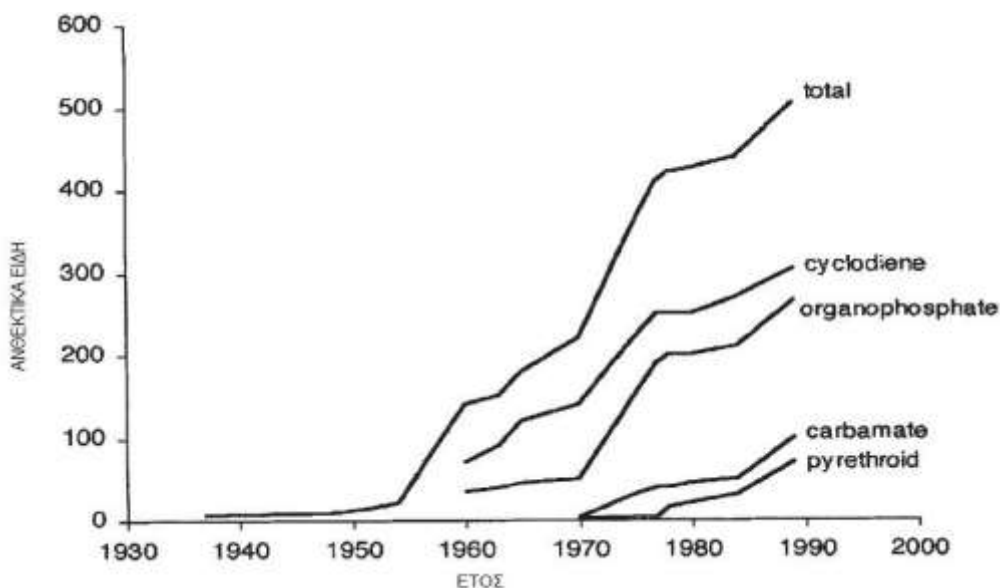
•Cyenoptyrafen: ακαρεοκτόνο που δρά ως METIs, αλλά σε διακεκριμένο υπομοριακό στόχο (succinate-CoQreductase, complexII, IRACGroup 25). Αναπτύχθηκε από την εταιρία NissanChemicals και έχει πολύ υψηλή ακαρεοκτόνο δράση και χαμηλή τοξικότητα στα ωφέλιμα.

•Cyflumetofen: ακαρεοκτόνο με εξειδικευμένη δράση εναντίον του τετράνυχου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Δρα επίσης ως METIs σε διακεκριμένους στόχους στο complexII σε πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις, μετά από ενζυμική ενεργοποίηση (εστεράση) εντός του ακάρεος στόχου. Αναπτύχθηκε πολύ πρόσφατα από την εταιρία OtsukaAgriTechnoCo., Ltd.

3. Ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα αντανάκλα γενετική προσαρμογή καθιστώντας τα αρθρόποδα ικανά να επιζούν, όταν εκθέτονται σε δόσεις εντομοκτόνου που έπρεπε να είναι θανατηφόρες (Denholm&Devine 2001). Παρόλο που είναι σχετικά πρόσφατο φαινόμενο (ανθεκτικότητα στο πρώτο συνθετικό εντομοκτόνο, το DDT, αρχικά αναφέρθηκε το 1940), η ανθεκτικότητα των εντόμων στα εντομοκτόνα είναι ευρέως διαδεδομένη. Το Σχήμα 3.1 δείχνει ότι οι αναφορές για ανθεκτικά είδη αρθρόποδα αυξάνουν σχεδόν εκθετικά από το 1950 έως το 1980, ακολουθώντας την επιτυχή εισαγωγή διαφορετικών κατηγοριών ή ομάδα συνθετικών εντομοκτόνων. Το 1990, περισσότερα από 500 είδη είχαν αναφερθεί να είναι ανθεκτικά σε μια ομάδα τουλάχιστον εντομοκτόνου, ενώ αρκετά από αυτά ήταν ανθεκτικά σε αρκετές κλάσεις ταυτόχρονα.

Σχήμα 3.1 Αύξηση του αριθμού των ειδών αρθροπόδων που έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στον χρόνο, συνολικά, και ξεχωριστά για τις τέσσερις πιο ευρέως διαδεδομένες τάξεις εντομοκτόνων (από Denholm&Devine2001).



Περίπου το 40% αυτών των ειδών είναι είδη υγειονομικού και κτηνιατρικού ενδιαφέροντος και το υπόλοιπο 60% αφορά σε έντομα γεωργικών καλλιεργειών (Denholm *et al.* 1998). Από τα είδη των αρθροπόδων για τα οποία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα το 88 % είναι έντομα (κλάση *Insecta*) και το 12 % είναι ακάρεα και αραχνίδια (κλάση *Arachnida*, τάξη *Acarina*). Το 92 % των ανθεκτικών ειδών εντόμων ανήκουν στις εξής τέσσερις τάξεις εντόμων: *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera* και *Lepidoptera*. Το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει κατσαρίδες, θρίπες, ψείρες και ψύλλους.

Αν και πρακτικώς όλα τα εντομοκτόνα επηρεάζονται από την ανθεκτικότητα, ο βαθμός και η εξάπλωσή της ποικίλει ανάμεσα στα είδη. Για μερικά έντομα η ανθεκτικότητα εκτείνεται σε λίγες συγγενείς ουσίες της ίδιας ομάδας και μπορεί να είναι μικρή και περιορισμένη σε μια μικρή γεωγραφικά περιοχή. Στο άλλο άκρο, κάποια πολύ επιζήμια για τις καλλιέργειες έντομα, όπως η *Plutella xylostella* (L.) (*Lepidoptera*: *Yponomeutidae*), ο δορυφόρος της πατάτας, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (*Coleoptera*: *Chrysomelidae*), η αφίδα της ροδακινιάς, *M. persicae*, ο αλευρώδης του βαμβακιού, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (*Hemiptera*: *Aleyrodidae*) είναι ανθεκτικά σε πάρα πολλά ή σχεδόν σε όλα τα διαθέσιμα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους.

Αν και από την ανθεκτικότητα επηρεάζονται περισσότερο τα παλαιότερα και πιο διαδεδομένα εντομοκτόνα, υπάρχει μια ανησυχητική αύξηση της ανθεκτικότητας και στα πιο καινούρια.

Μιας και τα εντομοκτόνα δεν έχουν μεταλλαξιογόνο δράση κατά την εφαρμογή τους στον αγρό, είναι φανερό ότι οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα έντομα συμβαίνουν ανεξάρτητα από την έκθεση τους σε αυτά, ενώ υπάρχουν οι μεταλλάξεις αυτές στον πληθυσμό πριν το εντομοκτόνο εισήχθη στην αγορά. Έτσι, η ανθεκτικότητα είναι ένα προσαρμοσμένο φαινόμενο αντανακλώντας την επιλογή ξεχωριστών κύριων κληρονομήσιμων γενετικών χαρακτηριστικών που συμβάλλουν θετικά στην επιβίωση ή αναπαραγωγή σε

περιβάλλον εκτεθειμένο σε εντομοκτόνα.

Η ροδακινιά, ο καπνός, η πιπεριά και άλλα σολανώδη φυτά είναι σημαντικές καλλιέργειες για την Ελλάδα, και για άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Στην Ελλάδα, οι καλλιεργούμενες με ροδακινιές, καπνό, πατάτες και πιπεριές εκτάσεις κατά το 2005 ήταν 50.000, 56.000, 45.000 και 3.800 εκτάρια αντίστοιχα (FAO Statistics 2005). Ένας από τους σοβαρότερους εχθρούς της ροδακινιάς, και ο σημαντικότερος του καπνού και άλλων σολανωδών καλλιεργειών, είναι η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος που προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών (Blackman & Eastop, 1984). Στις ποώδεις καλλιέργειες εκτός από άμεσες, προκαλεί επιπλέον σοβαρές έμμεσες ζημιές, μέσω της μετάδοσης μη-έμμεσων ιών (Kennedy *et al.* 1962, Van Emden *et al.* 1969, Katis *et al.* 1993).

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια υπάρχει ανάγκη για χρήση φιλικότερων μεθόδων καταπολέμησης των εχθρών των καλλιεργειών ως προς το περιβάλλον, όπως σκευάσματα διαφορετικά των χημικών εντομοκτόνων (Karagounis *et al.* 2007, Perring *et al.* 1999, Edelson *et al.* 2002) ή βιολογική καταπολέμηση (Carver *et al.* 1987), ο έλεγχος του *M. persicae* παγκοσμίως βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην χρήση χημικών εντομοκτόνων. Η αλόγιστη χρήση τους για περισσότερο από τέσσερες δεκαετίες έχει δημιουργήσει προβλήματα ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας εφαρμογών αλλά και της ποσότητας του εντομοκτόνου. Επίσης, τη μείωση της απόδοσης της καλλιέργειας σε συνδυασμό με το ρίσκο για αυξημένα υπολείμματα στις τροφές και υποβάθμιση του περιβάλλοντος μιας και αυξάνονται οι ξενοβιοτικές ουσίες στο αέρα, το έδαφος και τον νερό. Από το 1950 και μετά, η αλόγιστη χρήση Στην Ελλάδα, τα νεονικοτινοειδή συχνά χρησιμοποιούνται εναντίον του *M. Persicae* σε ροδάκινα και καπνά. Το imidacloprid είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο και έχει αντικαταστήσει τα εντομοκτόνα άλλων τάξεων. Στον καπνό το 45% των εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν το 2003 ανήκαν στην τάξη των νεονικοτινοειδών. Αντιθέτως, στις ροδακινιές τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται συχνότερα έναντι των νεονικοτινοειδών (40%

έναντι 15% των νεονικοτινοειδών) λόγω της χρήσης τους για τον έλεγχο και άλλων εντομολογικών εχθρών. Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια οι μελέτες στο *M. persicae* έχουν δείξει την ύπαρξη ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά και καρβαμυδικά εντομοκτόνα, σπάνια στα πυρεθροειδή και αποτελεσματικότητα των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων. Πιο συγκεκριμένα, ο Ιωαννίδης (1999) είχε βρει ότι οι πληθυσμοί του *M. persicae* από καπνό και ροδακινές είχαν αναπτύξει ισχυρή ανθεκτικότητα στο pirimicarb και την τάση για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο imidacloprid για τους πληθυσμούς που προέρχονται μόνο από καπνό. Επίσης, οι πληθυσμοί από την βόρεια Ελλάδα εμφάνισαν επίπεδα εστερασών R2 και R3. Ίδια αποτελέσματα είχαν βρει για τα έτη 1998 έως 2000 οι Cox *et al.* (2004).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς είναι ένα δυναμικό φαινόμενο και χρειάζεται συνεχή παρακολούθηση. Στην Ελλάδα, εκτός από την ισχυρή τοπική πίεση επιλογής των εντομοκτόνων, υπάρχει και ισχυρή τοπική διακύμανση στην κατηγορία του βιολογικού κύκλου της αφίδας, που μπορεί να επηρεάζει τη δυναμική ανάπτυξης της ανθεκτικότητας. Στην βόρεια Ελλάδα το *M. persicae* αναπαράγεται μια φορά σεξουαλικά στον πρωτεύοντα ξενιστή και στη συνέχεια παρθενογενετικά σε ποώδεις ξενιστές. Σε αντίθεση, στην νότια και την βορειοανατολική Ελλάδα οι πληθυσμοί του *M. persicae* αποτελούνται κυρίως από μη σεξουαλικούς γενοτύπους (Margaritopoulos *et al.* 2002). Η σεξουαλική αναπαραγωγή που λαμβάνει χώρα στη βόρεια Ελλάδα μπορεί να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας, λόγω ανασυνδυασμού του γενετικού κώδικα μεταβάλλεται η συχνότητα τους σε σχέση με τη μη σεξουαλική αναπαραγωγή. Επίσης, υψηλή μεταναστευτικοί ρυθμοί εμφανίζονται την άνοιξη από τα ροδάκινα σε άλλα φυτά με αποτέλεσμα τη διασπορά ανθεκτικών γενοτύπων. Από την άλλη, μπορεί να υπάρχει πίεση επιλογής ενάντια των παρθενογενετικά ανθεκτικών γενοτύπων μέσω του χειμώνα, επειδή πολλοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα στο *M. persicae* έχουν σχετιστεί με κόστος στην υγεία τους (fitness costs) (Foster *et al.* 2000, Foster *et al.* 1997, Foster *et al.* 2002).

3.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Η χρήση εντομοκτόνων αναμφισβήτητα έλυσε πολλά προβλήματα όσον αφορά στην αντιμετώπιση εντόμων που προκαλούν καταστροφές στις καλλιέργειες. Εκτεταμένη χρήση των εντομοκτόνων όμως προκάλεσε την επιλογή ατόμων του πληθυσμού που ήταν ανθεκτικά στα συγκεκριμένα εντομοκτόνα. Η ανθεκτικότητα των ατόμων αυτών οφείλεται σε μεταλλάξεις που συνέβησαν σε συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία προσέδιδαν την ικανότητα ανοχής των ατόμων στα εντομοκτόνα. Οι μεταλλάξεις αυτές όμως δεν επάγονται από την έκθεσή τους στο εντομοκτόνο. Τα άτομα που φέρουν εκ των πρωτέρων αυτά τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα επιβιώνουν, οδηγώντας έτσι στην επιλογή των συγκεκριμένων αλληλομόρφων σε επίπεδο πληθυσμού.

Έχουν παρατηρηθεί τρεις κύριοι μηχανισμοί που μπορούν να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα έπειτα από κάποια μετάλλαξη. Ο πρώτος αφορά στη μετάλλαξη ενός γονιδίου που προκαλεί κάποια δομική αλλαγή στο προϊόν του γονιδίου, προσδίδοντας ανθεκτικότητα. Στη περίπτωση που η δομική αλλαγή βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης του εντομοκτόνου, το εντομοκτόνο δεν μπορεί να δράσει με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα. Δομική αλλαγή μπορεί να συμβεί και σε κάποιο ένζυμο ώστε αυτό να μην μπορεί να χρησιμοποιήσει το εντομοκτόνο ως υπόστρωμα με αποτέλεσμα το εντομοκτόνο να μεταβολίζεται πριν προλάβει να δράσει.

Ο δεύτερος μηχανισμός έχει να κάνει με αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου. Έχει παρατηρηθεί σε γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά για την παραγωγή μεταβολικών ενζύμων τα οποία διασπών ξενοβιοτικές ουσίες, οι οποίες θα μπορούσαν να βλάψουν το έντομο. Με την αύξηση των αντιγράφων των γονιδίων παράγονται μεγάλες ποσότητες ενζύμου, με αποτέλεσμα να διασπάται όλη η ποσότητα του εντομοκτόνου, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο ανθεκτικότητα στο έντομο.

Ο τρίτος μηχανισμός ανθεκτικότητας που έχει παρατηρηθεί, έχει να κάνει και αυτός με την αύξηση της ποσότητας κάποιου μεταβολικού ενζύμου, που οφείλεται όμως σε μετάλλαξη

στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο. Στην περίπτωση των προ-εντομοκτόνων, τα οποία πρέπει να μεταβολιστούν για να δράσουν, ανθεκτικότητα μπορεί να εμφανιστεί με μετάλλαξη που μειώνει την ποσότητα του μεταβολικού ενζύμου που μεταβολίζει το προ-εντομοκτόνο.

3.1.1 Μετάλλαξη του β νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της αφίδας *Myzus persicae* σε νικοτινοειδή εντομοκτόνα

Ο έλεγχος της αφίδας *M. persicae* έγγειτε σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση εντομοκτόνων με αποτέλεσμα το είδος να αναπτύξει πολλαπλή ανθεκτικότητα σε χημικά όπως οργανοφωσφατάσες, καρβαμάτες και πυρεθροειδή. Οι μοριακοί μηχανισμοί της ανθεκτικότητας της *M. persicae* σε εντομοκτόνα περιλαμβάνουν υπερπαραγωγή αποτοξινωτικών καρβοξυλεστερασών (E4 ή FE4) που απονέμουν ανθεκτικότητα κυρίως σε οργανοφωσφατάσες, και δύο μορφές ανθεκτικότητας σε περιοχές στόχους που περιλαμβάνουν μετάλλαξη στη πρωτεΐνη της ακετυλοχολινεστεράσης (τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση, MACE), προσδίδοντας ανθεκτικότητα σε διμεθυλοκαρβαμικά, και από τα κανάλια ιόντων νατρίου (knockdown ανθεκτικότητα, kdr) δίνοντας ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή. Νεονικοτινοειδή όπως το imidacloprid, tothiamethoxam, toclothianid και το acetamiprid, δεν επηρεάζονται από αυτούς τους μηχανισμούς και είναι τα κύρια μέσα ελέγχου.

Πρόσφατα έγιναν βιοχημικές και γενομικές προσεγγίσεις ώστε να ερευνηθεί η ανθεκτικότητα ενός κλώνου *M. persicae* σε νεονικοτινοειδή, παρουσιάζοντας περίπου 40 πτυχές ανθεκτικότητας σε αυτά. Η ανθεκτικότητα συνδέθηκε με πολλαπλούς διπλασιασμούς ενός μόνο P450 γονιδίου (CYP6CY3), με τις ανθεκτικές αφίδες να φέρουν περίπου 18 αντίγραφα του γονιδίου σε σχέση με τα 2 αντίγραφα που εμφανίζονταν στις ευαίσθητες αφίδες. Παρ' όλα αυτά ύστερα από μελέτες σύνδεσης και αλληλούχησης, δεν βρέθηκαν

αποδειξείς ότι η τροποποίηση της δομής του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR, η νεονικοτινική περιοχή στόχος), συνέβαλε στην ανθεκτικότητα του κλώνου. Αν και οι πληθυσμοί των αφίδων συνεχίζουν να ελέγχονται αποτελεσματικά με νεονικοτινοειδή, η ανθεκτικότητα συνεχίζει να αποτελεί πρόβλημα για άλλα είδη εντόμων. Όπως βρέθηκε για τη *M. persicae* η υπερέκφραση ενός ή περισσότερων P450s φαίνεται να αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ανθεκτικότητας παράσιτων εντόμων.

Η επιλεκτικότητα των νεονικοτινοειδών ως προς τα έντομα, οφείλεται κυρίως στη μεγάλη συγγένεια των nAChR στα έντομα. Οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι περιφεριακά με κανάλια ιόντων που αποτελούνται από πέντε υπομονάδες κανονισμένες σε συνδιασμούς από διαφορετικούς συνδιασμούς τύπων υπομονάδων. Τα γονιδιώματα εντόμων που έχουν αλληλουχηθεί μέχρι σήμερα περιέχουν περίπου δέκα γονίδια που κωδικοποιούν εναλλακτικές nAChR υπομονάδες και έξι γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί στη *M. persicae*.

Ως προς την ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων των υπομονάδων της nAChR, η N-τελική περιοχή της *M. persicae* nAChR α1-α5 και β1 υπομονάδων, που περιλαμβάνουν τις συντηρημένες περιοχές (βρόγχοι A με F) όπου βρίσκεται η περιοχή σύνδεσης της ακετυλοχολίνης και του νεονικοτινοειδούς, πολλαπλασιάστηκαν με PCR (FRC ανθεκτικός κλώνος, 5191A κλώνος και 4106^A κλώνος) και εξετάστηκαν με νουκλεοτιδική αλληλούχηση. Παρ' όλο που βρέθηκε ένας μικρός αριθμός σιωμηλών SNPs στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των α1-α5 υπομονάδων της nAChR, δεν παρατηρήθηκε καμία μη-συνόνυμη αλλαγή και η συναγόμενη αμινοξική αλληλουχία στη περιοχή που μελετήθηκε ήταν απaráλλακτη μεταξύ όλων των κλώνων. Σε αντίθεση, όταν συγκρίθηκε η αλληλουχία της Mrβ1 υπομονάδας, παρατηρήθηκε ένα μη-συνόνυμο SNP αποκλειστικά στον FRC κλώνο, που προκαλεί αμινοξική αντικατάσταση της αργινίνης (AGA) από θρεονίνη (ACA) στην αμινοξική θέση 81 του βρόγχου D, που αποτελεί μια προβλεπόμενη θέση σύνδεσης αγωνιστή της β υπομονάδας της nAChR (Πίνακας 3.1.1).

Αναγνωρίστηκε μια σημακή μετάλλαξη στη περιοχή του βρόγχου D της β1 υπομονάδας της ακετυλοχολίνης του ανθεκτικού κλώνου FRC η οποία προκαλεί την αντικατάσταση της αργινίνης από θρεονίνη (R81T). Ο βρόγχος Δείνει μια από τις τρεις

περιοχές της $\beta 1$ υπομονάδας, που συνδιάζεται με τους βρόγχους A, B και C για το σχηματισμό της περιοχής σύνδεσης της ακετυλοχολίνης. Αρκετές ενδείξεις πειραμάτων, αποδεικνύουν ότι τα αμινοξέα εντός της συγκεκριμένης περιοχής του βρόγχου D αποτελούν καθοριστικό κλειδί για την νεονικοτινοειδική σύνδεση με την ακετυλοχολίνη. Οι $\beta 1$ υποδοχείς των εντόμων, είναι υψηλά συντηρημένοι σε αυτή την αμινοξική θέση και όλα τα είδη εντόμων που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα έχουν μια θετικά φορτισμένη αργινίνη στη συγκεκριμένη θέση (Πίνακας 3.1.1). Αντίθετα, οι β υπομονάδες των σπονδυλωτών σπάνια έχουν ένα φορτισμένο αμινοξύ στη συγκεκριμένη θέση, με την θρεονίνη να είναι η πιο συχνή (Πίνακας 3.1.1).

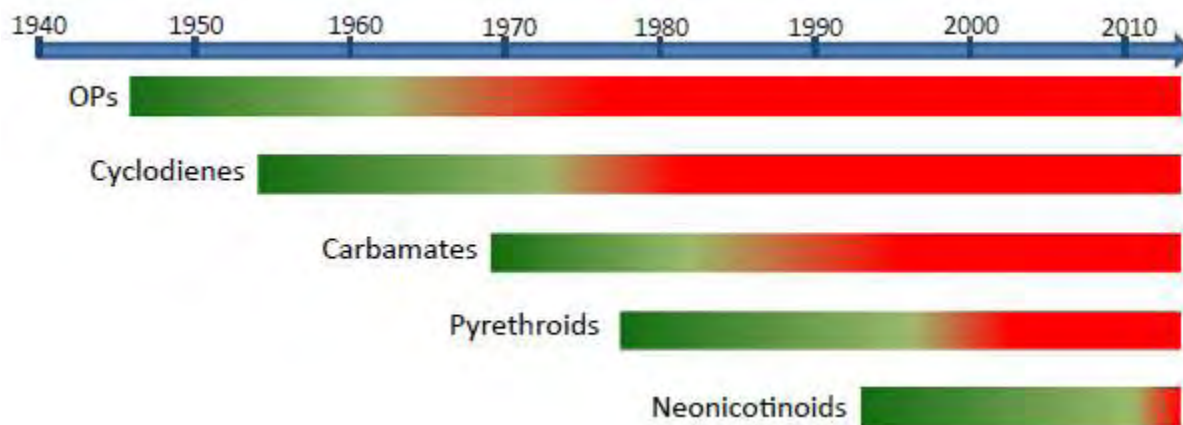
Πίνακας 3.1.1 Ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της θέσης σύνδεσης του αγωνιστή του βρόγχου D, νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης σπονδυλωτών και εντόμων

Species	Amino Acid Number of <i>Myzus persicae</i> $\beta 1$ Subunit										
	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
<i>Homo sapiens</i> $\beta 2$	N	V	W	L	T	Q	E	W	E	D	Y
<i>Gallus gallus</i> $\beta 2$	N	V	W	L	T	Q	E	W	E	D	Y
<i>Rattus norvegicus</i> $\beta 2$	N	V	W	L	T	Q	E	W	E	D	Y
<i>Drosophila melanogaster</i> $\beta 1$	C	V	W	L	R	L	V	W	Y	D	Y
<i>Anopheles gambiae</i> $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	S	D	Y
<i>Bemisia tabaci</i> $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	N	D	Y
<i>Locusta migratoria</i> $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	N	D	Y
<i>Heliothis virescens</i> $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	M	D	Y
<i>Ctenocephalides felis</i> $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	S	D	Y
<i>Myzus persicae</i> 4106A $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	R	D	Y
<i>Myzus persicae</i> 5191A $\beta 1$	N	V	W	L	R	L	V	W	R	D	Y
<i>Myzus persicae</i> FRC $\beta 1$	N	V	W	L	T	L	V	W	R	D	Y

3.1.2 Η εξέλιξη της ανθεκτικότητας της *Myzus persicae* σε εντομοκτόνα

Ο έλεγχος της *M. persicae* σε πολλές σοδιές έχει βασιστεί σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση χημικών εντομοκτόνων και η αλόγιστη χρήση τους με την πάροδο των χρόνων έχει οδηγήσει στη δημιουργία εκτενών και πολλαπλών μορφών ανθεκτικότητας. Η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο είδος χρονολογείται το 1955 (Anthon, 1955) με την ανθεκτικότητα πλέον να εμφανίζεται για τις περισσότερες τάξεις εντομοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων των οργανοφωσφατών, των καρβαμιδικών, των πυρεθροιδών, των κυκλοδιενών και των νεονικοτινοειδών (Εικόνα 3.1.2.1), κάνοντας την *M. persicae* ένα από τα πιο ανθεκτικά είδη παγκοσμίως (www.pesticideresistance.com).

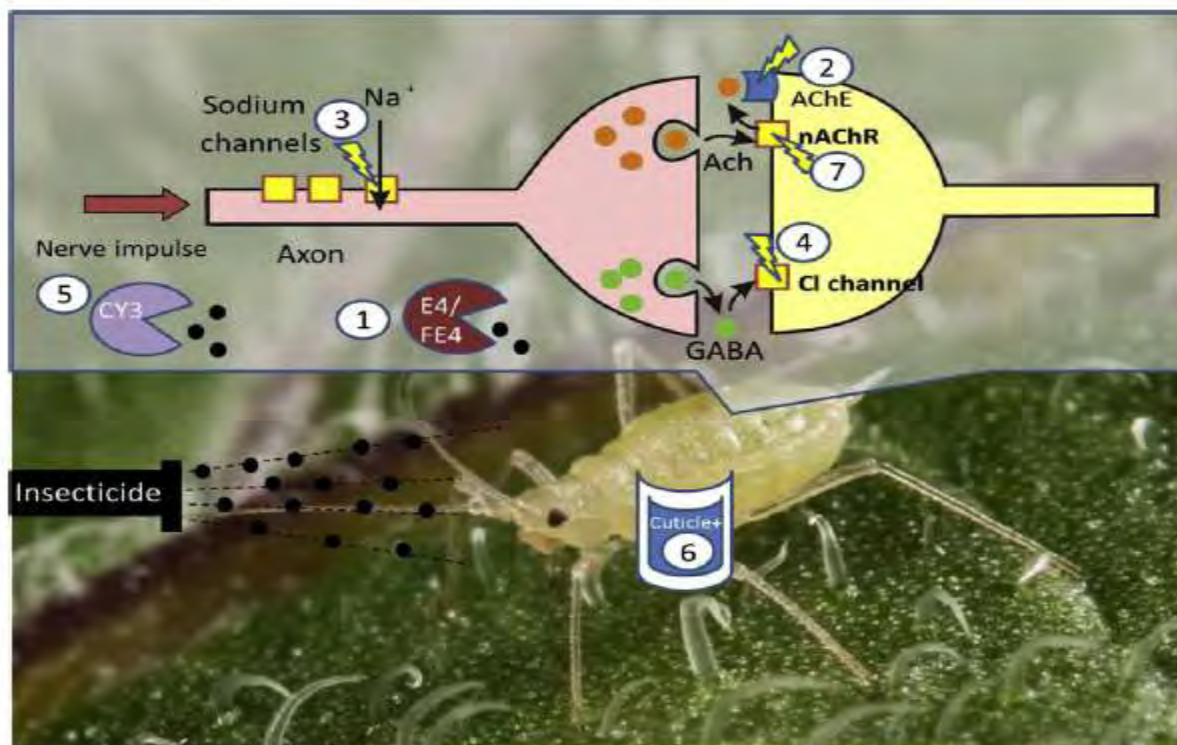
Εικόνα 3.1.2.1 Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στη *M. persicae*. Οι πράσινες μπάρες υποδεικνύουν τα χρόνια όπου τα εντομοκτόνα προσέφεραν καλό έλεγχο. Οι κόκκινες μπάρες υποδεικνύουν την δημιουργία και έλεγχο συμβιβάσιμης ανθεκτικότητας. OP's: οργανοφωσφατάσες.



Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετοί βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί που προσδίδουν ανθεκτικότητα στη *M. persicae*. Ο πρώτος μηχανισμός ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα που περιγράφεται στο συγκεκριμένο είδος αφίδας, είναι η αυξημένη παραγωγή καρβοξυλεστερασών που συνδιασκέπτονται ένα μεγάλο φάσμα ανθεκτικότητας σε μέλη των OP's, των (μονο-μεθυλ) καρβαμιδικών και των λιγότερο εκτεταμένων πυρεθροιδών τάξεων

(Εικόνα 3.1.2.2).

Εικόνα 3.1.2.2 Εικόνα 7 μηχανισμών ανθεκτικότητας που έχουν προσδιοριστεί στη *M. persicae*. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν αριθμηθεί 1-7, πολλοί από τους οποίους περιλαμβάνουν μετάλλαξη στόχων των εντομοκτόνων στο νευρικό σύστημα, και μια εικόνα σύναψης ενός εντόμου απεικονίζεται στη κορυφή. Αυξημένη έκφραση των E4/FE4 εστερασών προσδίδουν ανθεκτικότητα σε OP's, (μονο-μεθυλ) καρβαμικά και των λιγότερο εκτεταμένων πυρεθροειδών, με την απομόνωση και το μεταβολισμό αυτών των εντομοκτόνων πριν φτάσουν στο νευρικό σύστημα. 2. Μετάλλαξη (S431F) του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) που οδηγεί στην ανθεκτικότητα σε διμεθυλ-καρβαμικά. 3. Μετάλλαξη (L1014F, M918T, M918L) των φορτισμένων καναλιών νατρίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. 4. Μετάλλαξη (A302G) των GABA περιφραγμένων καναλιών χλωρίου που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κυκλοδιένια. 5. Αυξημένη έκφραση του P450 CYP6CY3 που προσδίδει ανθεκτικότητα σε νικοτινοειδή και νεονικοτινοειδή. 6. Μειωμένη διεισθητικότητα δια μέσω της επιδερμίδς που προσδίδει ανθεκτικότητα σε νεονικοτινοειδή. 7. Μετάλλαξη (R81T) του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR) που προσδίδει ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή.



Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η μετάλλαξη του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης και η αναισθησία σε διμεθυλο-καρβαμικά εντομοκτόνα. Συγκεκριμένα μέλη των εντομοκτόνων

της τάξης των καβαμιδικών, διατηρούν καλή αποτελεσματικότητα ενάντια πληθυσμών της *M. persicae* με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε εστεράσες και έχουν εξαιρετικό προφίλ ως αφιδοκτόνα (Fosteretal., 2002).παρ' όλα αυτά, στις αρχές της δεκαετίας του 1990 εντοπίστηκε σημαντική ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα εντομοκτόνα σε πληθυσμούς *M. persicae* από την Ελλάδα (Mooreetal., 1994). Αναλύσεις βιοχημικών αναχαιτίσεων έδειξαν πως η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα της αναισθησίας της περιοχής στόχου του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (AchE), μια υδρολάση σερίνης, που τερματίζει την ώθηση νευρικής μετάδοσης με την ταχεία υδρόλυση των νευροδιαβιβαστών της ακετυλοχολίνης στις χολινεργικές συνάψεις.

Ο τρίτος μηχανισμός περιέχει τη μετάλλαξη των φορτισμένων καναλιών νατρίου, η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Παρ' όλο που η υπερπαραγωγή εστερασών προσδίδει συμπαθητική ανθεκτικότητα στα περισσότερα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, αποδείχθηκε αργότερα πως η ανθεκτικότητα προκαλείται κυρίως από έναν μηχανισμό θέσης στόχου που ονομάζεται 'knockdown ανθεκτικότητα' ή kdr (Martinez-Torresetal., 1999)(Εικόνα 3.1.2.2 και Εικόνα 3.1.2.3).

Ο τέταρτος μηχανισμός περιέχει το διπλασιασμό και τη μετάλλαξη του γονιδίου της υπομονάδας του GABA υποδοχέα και την ανθεκτικότητα σε κυκλοδιενικά εντομοκτόνα. Ενώ η χρήση των κυκλοδιενικών εντομοκτόνων (endosulfan) έχει σταδιακά μειωθεί, χρησιμοποιούνταν για αρκετά χρόνια ως αφιδοκτόνα σε ένα σημαντικό εύρος από σοδιές προσφέροντας μια εναλλακτική σε προγράμματα ελέγχου ανθεκτικότητας καθώς δεν σύμπιπτε με άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας (π.χ. εστεράσες/kdr). Στα περισσότερα είδη εντόμων η ανθεκτικότητα σε κυκλοδιένια, προκύπτει από μετάλλαξη στον GABAυποδοχέα.

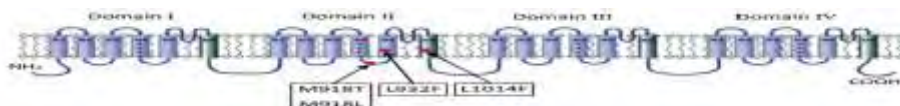
Ο πέμπτος μηχανισμός αποτελείται από την υπερέκφραση του P450 CYP6CY3 και την ανθεκτικότητα σε νικοτινοειδή και νεονικοτινοειδή. Ως αποτέλεσμα της εκτενούς ανθεκτικότητας σε OP's, καρβαμίτες και πυρεθροειδή, τα νεονικοτινοειδήπου είναι ανεπηρέαστα από μηχανισμούς ανθεκτικότητας που αναπτύχθηκαν για παλαιότερες ενώσεις, γρήγορα έγιναν ο βασικός τρόπος ελέγχου της *M. persicae* σε αρκετές σοδιές ύστερα από την κυκλοφορία τους στις αρχές της δεκαετίας του 1990 (NauenandDenholm, 2005). Με

ενδιαφέρον παρατηρήθηκε χαμηλή ανθεκτικότητα σε μελη της συγκεκριμένης χημικής τάξης που χαρακτηρίστηκε ως ‘φυσική ανοχή’, πολύ σύντομα από την κυκλοφορία του πρώτου νεονικοτινοειδούς (imidacloprid), σε συγκεκριμένους πληθυσμούς *M. persicae*, ειδικά σε αυτούς του καπνού (*M. persicaenicotiane*) (Devineetal., 1996, Nauenetal., 1996).

Ο έκτος μηχανισμός αφορά την μειωμένη διεισδυτικότητα των εντομοκτόνων δια μέσω της επιδερμίδας και την ανθεκτικότητα σε νεονικοτινοειδή. Η αρχική έρευνα του ανθεκτικού σε νεονικοτινοειδή κλώνου 5191A, πρότεινε πως η υπερέκφραση του CYP6CY3 δεν αποτελούσε το μοναδικό μηχανισμό που εμπλέκονταν στον ανθεκτικό φαινότυπο. Τα αποτελέσματα αναλύσεων έδειξαν πως η μειωμένη διεισδυτικότητα του εντομοκτόνου αποτελούσε έναν επιπλέον μηχανισμό ανθεκτικότητας στον 5191A κλωνο(Εικόνα 3.1.2.2).

Τέλος ο έβδομος μηχανισμός αφορά τη μετάλλαξη του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR) και την ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή. Παρ’ όλο που η αυξημένη έκφραση του CYP6CY3 και/ή μειωμένη διεισδυτικότητα προσδίδουν μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας σε νεονικοτινοειδή σε τοπικές βιοαναλύσεις, η πρακτική σημασία τους είναι περιορισμένη καθώς είναι ανεπαρκή ως προς την αποτελεσματικότητά τους στο πεδίο αυτών των εντομοκτόνων όταν εφαρμόζονται με τις συνιστώσες τιμές. Όμως η κατάσταση άλλαξε σημαντικά όταν το 2009 ένας κλώνος *M. persicae* (FRC) συλλέχθηκε από ροδάκινα στη νότιο Γαλλία, που φάνηκε να παρουσιάζει εξαιρετική ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή και επαρκούσε για την έκθεση της αποτελεσματικότητας πεδίου των εντομοκτόνων αυτής της κλάσης (Εικόνα 3.1.2.2).

Εικόνα 3.1.2.3 Σχήμα των φορτισμένων καναλιών νατρίου που αποτελούν στόχο των πυρεθροειδών εντομοκτόνων, επισημαίνοντας τις θέσεις των kdr/super-kdr μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της *M. persicae*στα πυρεθροειδή



3.1.3 Ανθεκτικότητα της *Myzus persicae* σε εντομοκτόνα στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, η αφίδα είναι ένα από τα πιο σημαντικά παρασιτικά έντομα του καπνού *Nicotianatabacum* L. (*Solanaceae*) και της ροδακινιάς *Prunus persica* L. (*Rosaceae*) από οικονομικής πλευράς. Παρ' όλο που είναι επιτακτικής ανάγκης η χρήση περιβαλλοντικά σύμφωνων μεθόδων ελέγχου, όπως η χρήση φυτουγειονομικών εναλλακτικών των χημικών εντομοκτόνων ή βιολογικού ελέγχου, ο έλεγχος της *M. persicae* παγκοσμίως παραμένει σχεδόν αποκλειστικά βασισμένος σε εντομοκτόνα. Η παρατεταμένη χρήση χημικών εντομοκτόνων για περίπου τέσσερις δεκαετίες επέφερε σημαντικά προβλήματα ανθεκτικότητας. Η αφίδα ανέπτυξε πολλαπλούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα. Ένας μηχανισμός περιλαμβάνει την υπερπαραγωγή των εστερικών ενζύμων E4/FE4, που προσδίδουν ανθεκτικότητα ευρέως φάσματος σε OP's, καρβαμιδικά και εν μέρη σε πυρεθροειδή. Ένας άλλος μηχανισμός βασίζεται σε αναίσθητες (τροποποιημένες) ακετυλοχολινεστεράσες (AChE) (MACE) που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διμεθυλο-καρβαμιδικά όπως το pirimicarb και το triazamate. Επίσης στην Ελλάδα υπάρχει και η knockdown ανθεκτικότητα kdr της *M. persicae*. Είναι πολύ συχνό φαινόμενο να εμφανίζεται παραπάνω του ενός εκ των τριών αυτών μηχανισμών ανθεκτικότητας στην ίδια αφίδα ατομικά με αποτέλεσμα την αχρήστευση των εμπορικών αφιδοκτόνων σκευασμάτων. Αυτοί οι τρεις μηχανισμοί δεν επηρεάζουν τα νεονικοτινοειδή που αποτελούν διακεκριμένη τάξη εντομοκτόνων για τον έλεγχο της *M. persicae* και άλλων αφίδων.

Στη παρούσα διατριβή αναζητούμε την ύπαρξη της μεταλλαγής R81T που προσδίδει ανθεκτικότητα σε νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, με τον έλεγχο πληθυσμών *M. persicae* από περιοχές της Ελλάδας.

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1 Συλλογή αφίδων

Υλικά

1. Φορητό ψυγείο
2. Πλαστικές σακούλες που κλείνουν αεροστεγώς
3. Χαρτί κουζίνας
4. Κλαδευτήρι
5. Αυτοκόλλητες ετικέτες

Πραγματοποίηση συλλογής δειγμάτων

Αφού εντοπιστούν τα μολυσμένα φυτικά μέλη (κυρίως νεαρά φύλλα και τρυφεροί βλαστοί) πραγματοποιείτε αφαίρεση των τμημάτων με την χρήση του κλαδευτηριού. Στη συνέχεια τυλίγονται προσεκτικά σε χαρτί κουζίνας, για την αποφυγή τραυματισμού των εντόμων και την απορρόφηση την υγρασίας, και τοποθετούνται στις πλαστικές σακούλες από τις οποίες έχει αφαιρεθεί μερικώς ο αέρας και σφραγίζονται αεροστεγώς.

Κάθε ξεχωριστό φυτικό μέλος στο οποίο υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός αφίδων 10-20 από διαφορετικό φυτό, θεωρείτε μοναδικό δείγμα και συσκευάζεται ξεχωριστά. Στην αυτοκόλλητη ετικέτα αναγράφονται η ημερομηνία και ο τόπος συλλογής καθώς και το φυτικό είδος από το οποίο προέρχονται τα δείγματα και τοποθετείτε εξωτερικά από την σακούλα συλλογής.

Μετά από την συλλογή και την αποθήκευση κάθε δείγματος η σακούλα τοποθετείτε στο φορητό ψυγείο για την διατήρηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου διαστήματος των δειγμάτων μέχρι την επιστροφή στο εργαστήριο.

4.1.1 Δείγματα Αφίδων

Για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 131 δείγματα αφίδων από παρασιτικούς πληθυσμούς πιπεριάς, ροδακινιάς, αγριοκαρδαμούδας (*capsellabursapastoris*) και κάρδαμο (*LepidiumDrada*), από περιοχές της Ελλάδας όπως το Νεόκαστρο (Μελίκη Ημαθίας), την Αλεξάνδρεια (Ημαθίας), Ιεράπετρα (Λασιθίου Κρήτης) και από το Τυμπάκι (Ηράκλειο Κρήτης).

4.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA των δειγμάτων μας πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους:

- Μέθοδο Chelex
- Μέθοδος με χρήση Tris-HCL

4.2.1 Μέθοδος Chelex

Για τη συγκεκριμένη μέθοδο απομόνωσης DNA τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: Chelex 100 (Bio-Rad) και απεσταγμένο νερό.

Σε tube με 40μl 5% Chelex (Bio-Rad) ομογενοποιείται μια αφίδα *M. persicae*, πραγματοποιείται vortex για 5-10 sec, ακολουθεί επώαση στους 56°C για 35 min και ακολούθως επώαση στους 95°C για 15 min. Πραγματοποιείται vortex για 5-10 sec και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στις 1200rpm για 2 min. Τέλος γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube και αποθηκεύεται στους -20°C.

4.2.2 Μεθοδος με tris-HCL

- Διάλυμα 1 (0,25 HCL)

Προετοιμάζεται το διάλυμα σε αποστειρωμένο δοχείο (χρησιμοποιούνται πλαστικά tubes)

Προθέτονται 215μl υδροχλωρικού οξέος 0,25M

Προσθέτονται 9,875ml απεσταγμένο νερό

- Διάλυμα 2 (0,5M TrisHCL (pH8))

Αναμειγνύονται 5ml 1M TrisHCL με 5ml απεσταγμένο νερό σε αποστειρωμένο δοχείο

- Διάλυμα 3 (0,25M NaOH)

Διαλύονται 0,2g υδροξειλίου του νατρίου σε 20ml απεσταγμένο νερό σε αποστειρωμένο tube.

- Διάλυμα 4

2% TritonX 100 (φτιάχνεται με απεσταγμένο νερό)

Μέθοδος: Τοποθετείται μια αφίδα στο πάτο ενός καλής ποιότητας erppendorftubeχωρητικότητας 1,5ml. Προσθέτονται 20μl του διαλύματος 3 (0,25NaOH) στην αφίδα και σιγουρευόμαστε πως έχει καλυφθεί πλήρως από το υγρό. (μπορούμε να ομογενοποιήσουμε την αφίδα με ένα αποστειρωμένο κίτρινο tip). Επωάζονται τα erppendorf στους 25°Cολονύχτια σε λουτρό θερμαντικής πλάκας (μειώσαμε το χρόνο επώασης στις 2 ώρες και πάλι πήραμε καλά αποτελέσματα περιστασιακά). Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται τα δείγματα σε μέγιστη ταχύτητα για λίγα δευτερόλεπτα αν το υγρό έχει συγκεντρωθεί στο καπάκι. Ύστερα επωάζονται τα δείγματα στους 99°C για 3 λεπτά. Πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα, αν το υγρό έχει συγκεντρωθεί στο καπάκι των tubes. Προσθέτονται 10μl του διαλύματος 1 (0,25M HCL), 5μl του διαλύματος 2 (0,5 Tris-HCL) και 5μl του διαλύματος 4 (2% TritonX-100). Επωάζονται για 3 λεπτά στους 99°Cόπως παραπάνω, στη συνέχεια αφήνονται τα δείγματα να κρυώσουν για δυο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύονται στους -20°C. Συνήθως κάνουμε διάλυση 1:10 του δείγματος και χρησιμοποιούμε 1μl του διαλύματος αυτού για PCR.

4.3 PCR και Ηλεκτροφόρηση

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι αναμφισβήτη η πιο σημαντική εργαστηριακή τεχνική που έχει ανακαλυφθεί. Η ευκολία με την οποία μπορεί να γίνει, το χαμηλό κόστος και ο μοναδικός συνδιασμός ειδικότητας και ευαισθησίας μαζί με την μεγάλη ελαστικότητά της έχει οδηγήσει σε μια πραγματική επανάσταση στο κλάδο της γενετικής. Παρά το μεγάλο αριθμό παραλλαγών του βασικού θέματος της PCR, η αντίδραση από μόνη της εξαρτάται από λίγα μόνο υλικά. Αυτά είναι τα ακόλουθα: νερό, PCRBuffer, $MgCl_2$, dNTPs, primers, DNA στόχος και πολυμεράση.

4.3.1 PCR

Αποστειρωμένα ependorf τοποθετούνται σε στατό για να ετοιμαστούν τα δείγματα που θα πολυμεριστούν (PCR). Κάθε δείγμα πρέπει να έχει συνολικό όγκο 25μl. Σε καθένα από τα ependorf εισάγονται 2μl απομονωμένου DNA κλώνου αφίδας με τη χρήση πιπέτας, αλλάζοντας tip για κάθε δείγμα για να μην μολυνθούν τα DNA (πιπέτα 0,2-2μl ή 2-20μl). Ετοιμάζεται και ένα ependorf δίχως DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως αρνητικό. Σε άλλο ependorf ετοιμάζεται το μείγμα με τα αντιδραστήρια που θα προστεθούν στο τελικό διάλυμα για την PCR. Στο μείγμα αυτό θα περιέχεται το άθροισμα του όγκου των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθεί μαζί με το αρνητικό, συν ένα. Ανάλογα με την Taq πολυμεράση που θα χρησιμοποιηθεί αλλάζει ο όγκος του κάθε αντιδραστηρίου αλλά και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR. Κατά τη δημιουργία του μίγματος αλλάζουν συνεχώς τα tips για να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις. Ο συνολικός όγκος της Taq υπολογίζεται με την μέθοδο των τριών ενώ ο τελικός όγκος των υπόλοιπων αντιδραστηρίων με την μέθοδο $C_{αρχ} V_{αρχ} = C_{τελ} V_{τελ}$. Η Taq προστίθεται τελευταία. Στη συνέχεια το μείγμα γίνεται Vortex για λίγα δευτερόλεπτα ώστε να αναδευθεί το μίγμα (χρήση πιπέτας χωρητικότητας 2μl-20μl και 20μl-200μl).

Αφού ετοιμαστεί το μίγμα με τα αντιδραστήρια προστίθενται 23μl από αυτό σε καθένα απο τα ependorf που περιέχουν το απομονωμένο DNA κλώνων αφίδας, ώστε να έχουμε δείγματα συνολικού όγκου 25μl το καθένα (2μl απομονωμένο DNA + 23μl μίγματος αντιδραστηρίων = 25μl διαλύματος για PCR). Τα δείγματα αυτά, τοποθετούνται στο μηχανήμα για PCR στις προβλεπόμενες για την αντίδραση συνθήκες.

(φοράμε γάντια σε όλα τα παραπάνω βήματα)

Taqpolymerase: One Taq (NEB 5000U/ml)

Συνθήκες αντίδρασης: Αρχική αποδιάταξη 94°C για 4 λεπτά, 35 κύκλοι: 94°C για 30 sec, 58°C για 15 sec και 72°C για 15 sec.

Αντιδραστήρια: Buffer 1X, dNTP's C=10mM το καθένα, MgCl₂ (THERMOSCIENTIFIC 50mM MF-510MG) C=25mM, H₂O, OneTaqpolymerase, PrimerF-12 (CCT-GCA-GCT-ATT-AAA-ATA-TCC-A) C=25pmol/μl, PrimerR-12 (ACG-TTA-GAA-AGG-AAA-CTG-TTT-A) C=25pmol/μl.

Προϊόν PCR: ~200bp

	C	Vol	Final C	Sum
Buffer	1	2.5 <u>ul</u>	1X	
dNTP's	10 <u>mM</u> each	0.5 <u>ul</u>	0.2 <u>mM</u>	
MgCl ₂	25 <u>mM</u>	0.75 <u>ul</u>	1.5 <u>mM</u>	
H ₂ O	1	18.65 <u>ul</u>		
<u>Taq</u>		0.2 <u>ul</u>	1U	
Primer-F12	25 <u>pmol/ul</u>	0.2 <u>ul</u>	0.2 <u>μM</u>	
Primer-R12	25 <u>pmol/ul</u>	0.2 <u>ul</u>	0.2 <u>μM</u>	

Χρησιμοποιούνται 5μl από το κάθε πολυμερισμένο διάλυμα και 2μl Buffer χρωστικής σε gel αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση.

Taqpolymerase: One Taq (Biolabs 5000U/ml)

Συνθήκες αντίδρασης: Αρχική αποδιάταξη 94°C για 30 λεπτά, 35 κύκλοι: 94°C για 30 sec, 58°C για 15 sec και 68°C για 15 sec.

Αντιδραστήρια: Buffer 1X, dNTP's C=10mM το καθένα, MgCl₂ (THERMOSCIENTIFIC 50mM-510MG) C=25mM, H₂O, Taqpolymerase OneTaq, PrimerF-12 (CCT-GCA-GCT-ATT-AAA-ATA-TCC-A) C=25pmol/μl, PrimerR-12 (ACG-TTA-GAA-AGG-AAA-CTG-TTT-A) C=25pmol/μl.

Προϊόν PCR: ~200bp

	C	Vol	Final C	Sum
Buffer	1	5 <u>ul</u>	1X	
dNTP's	10 <u>mM</u> each	0.5 <u>ul</u>	0.2 <u>mM</u>	
MgCl ₂	25 <u>mM</u>	-	1,8 <u>mM</u>	
H ₂ O	1	16.9 <u>ul</u>		
<u>Taq</u>		0.2 <u>ul</u>	0,8U	
Primer-F12	25 <u>pmol/ul</u>	0.2 <u>ul</u>	0.2 <u>μM</u>	
Primer-R12	25 <u>pmol/ul</u>	0.2 <u>ul</u>	0.2 <u>μM</u>	

Χρησιμοποιούνται 5μl από το κάθε πολυμερισμένο διάλυμα και 2μl Buffer χρωστικής σε gel αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση.

4.3.2 Παρασκευή διαλύματος TAE και Gel Αγαρόζης

TAE 50 X	
250 ml	100 ml
60,5 gr Tris – base	24,20 Tris – base
14,25 ml Acetic Acid	5,7 ml Acetic Acid
25 ml EDTA	10 ml EDTA

Το Acetic Acid χορηγείται μετά από το EDTA.

Το tris-base είναι της εταιρίας Merck με κωδικό 1.08382.0500 (500gr).

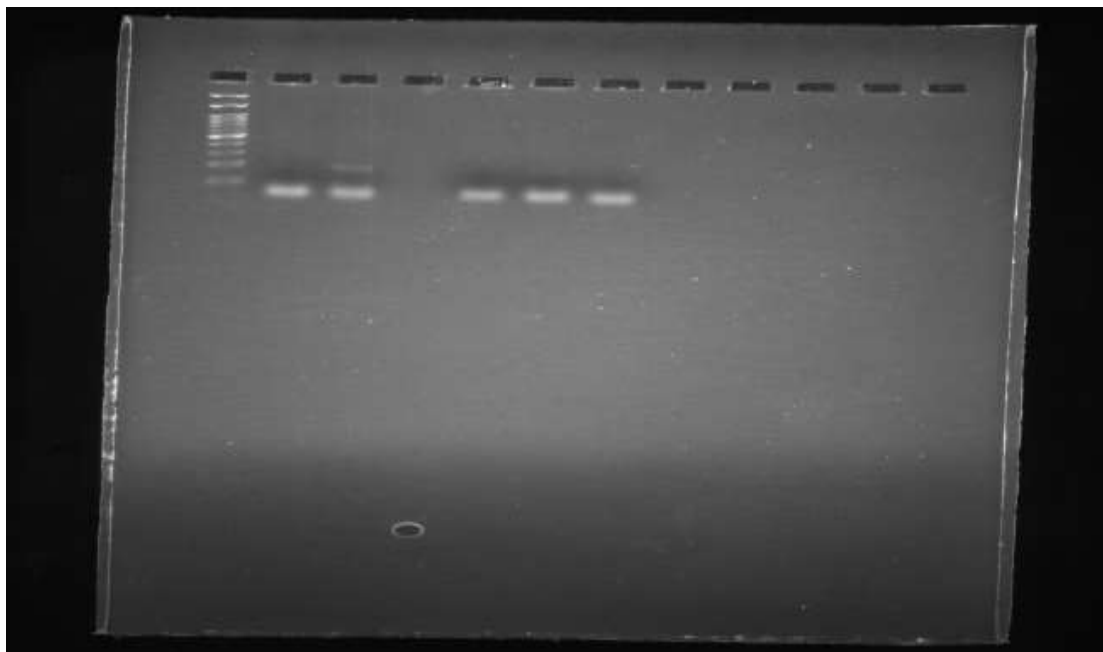
Το Acetic Acid είναι της εταιρίας Sigma με κωδικό E-7889 (100ml).

Για το gel αγαρόζης τοποθετούνται 50ml διαλύματος TAE και 1gr αγαρόζη σε κωνική φιάλη. Το μίγμα τοποθετείται στον μαγνητικό αναδευτήρα και αναδεύεται, μαζί με θέρμανση, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Αφού κρυώσει λίγο το διάλυμα, προστίθεται 1μl βρωμιούχο αιθίδιο. Πραγματοποιείται ανάδευση και το διάλυμα περιχύνεται στη συσκευή πηκτής, όπου έχει τοποθετηθεί ήδη η χτένα για τη δημιουργία των πηγαδιών όπου και αφήνεται μια ώρα να κρυώσει, ώστε να πήξει το gel.

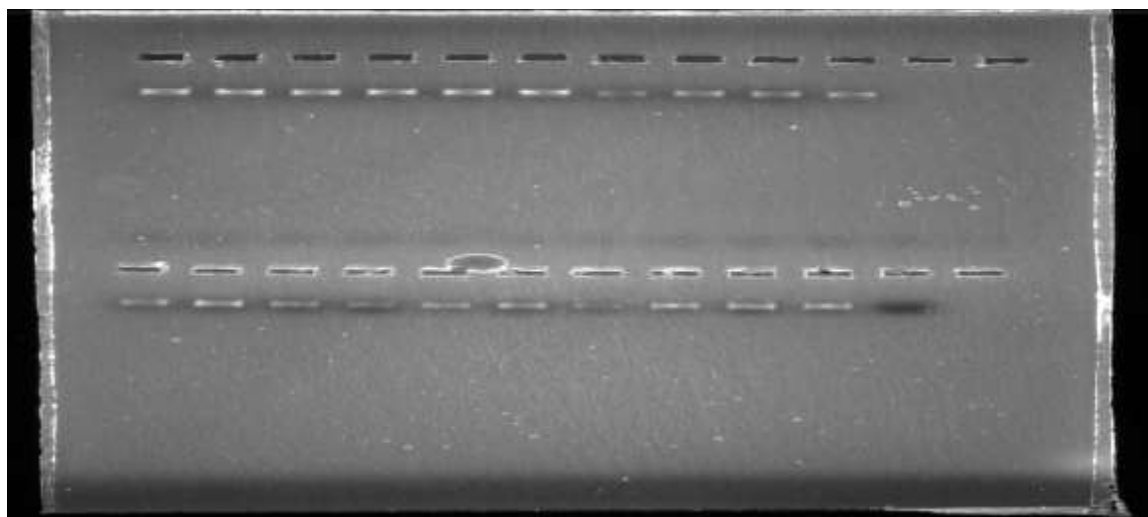
4.3.3 Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 5μl από το κάθε πολυμερισμένο διάλυμα και 2μl Buffer χρωστικής σε gel αγαρόζης. Ένα δείγμα ανά πηγαδάκι. Το gel αφέθηκε να τρέξει στα 100-150V για περίπου μισή ώρα και στη συνέχεια το μεταφέρθηκε στο UV Box για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων της PCR (Εικόνα 4.3.3.1, Εικόνα 4.3.3.2, Εικόνα 4.3.3.3)

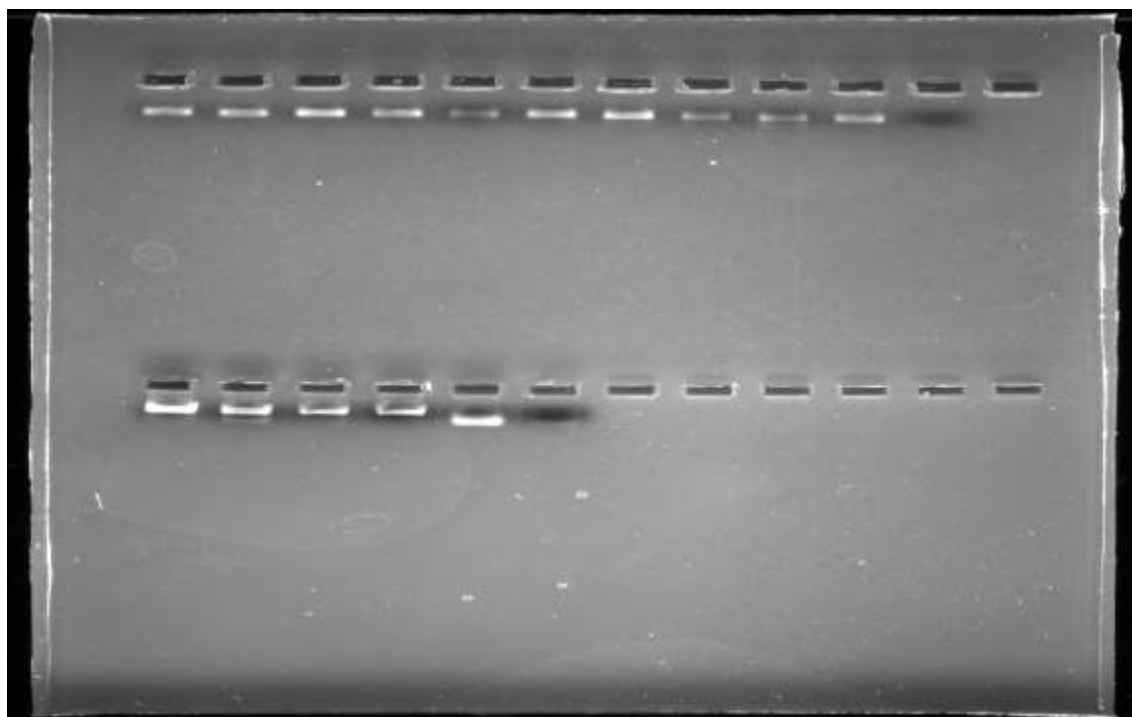
Εικόνα 4.3.3.1: Αποτέλεσμα PCR ~200bp



Εικόνα 4.3.3.2: Αποτέλεσμα PCR ~200bp



Εικόνα 4.3.3.3: Αποτέλεσμα PCR ~200bp

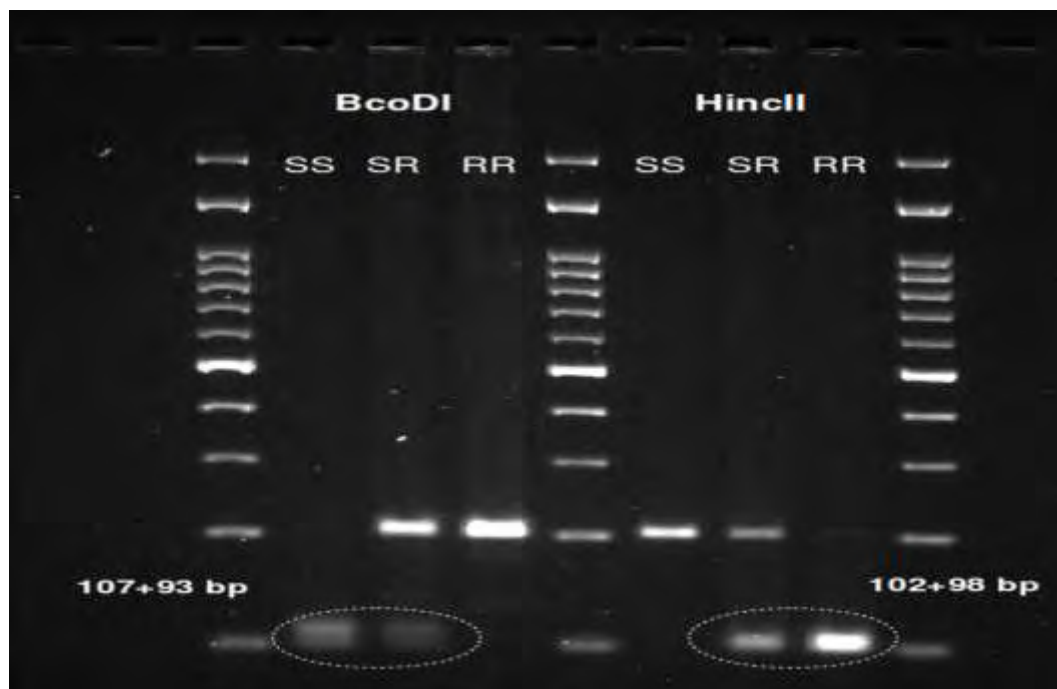


4.4 Κοπή με ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφόρηση

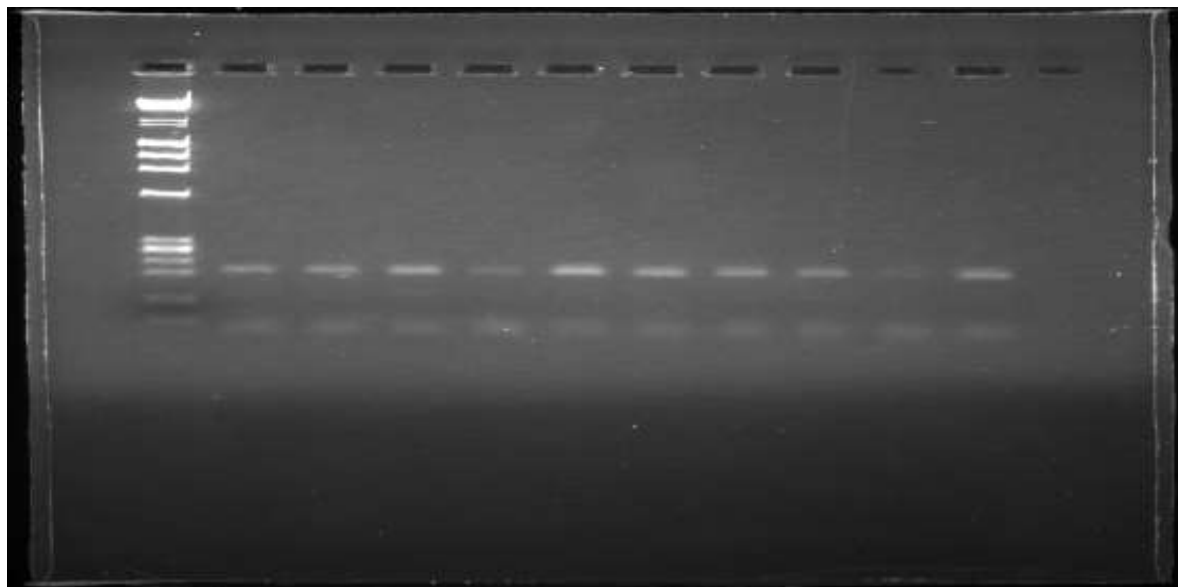
Σε 6 μ l από το προϊόν της PCR προστέθηκαν 4U από το ένζυμο BcoDI (NewEnglandBiolabs) μαζί με 1 \times NEBbuffer 4. Επίσης για το ένζυμο HincII (NewEnglandBiolabs) σε 6 μ l από το προϊόν της PCR προστέθηκαν 4U από το ένζυμο μαζί με 1 \times NEBbuffer 3 και 1 \times BSA. Η τελική συγκέντρωση και των δύο αντιδράσεων ήταν 20 μ l. Η αντίδραση επωάστηκε στους 37°C για 4 ώρες. Στην συνέχεια 10 μ l των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% με χρώση GelRed 4 μ l για 50mlTAE.

Στο μεταλλαγμένο (ανθεκτικό) κόβει το HincII στις 98 και 102 βάσεις ενώ στο ευαίσθητο κόβει το BcoDI στις 95 και 105 βάσεις (Εικόνα 4.4.1)

Εικόνα 4.4.1: Αποτελέσματα κοπής BcoDI και HincII σε γελαγρόζη. Στο μεταλλαγμένο (ανθεκτικό) κόβει το HincII στις 98 και 102 βάσεις ενώ στο ευαίσθητο κόβει το BcoDI στις 95 και 105 βάσεις



Εικόνα 4.4.2: Αποτελέσματα κοπής σε gel αгарόζης που πάρθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας



5. Αποτελέσματα

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR και στη συνέχεια σε κοπή με ένζυμα περιορισμού για τον έλεγχο ύπαρξης της μετάλλαξης R81T στη β-υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που προσδίδει ανθεκτικότητα στα νεονικοτιοειδή εντομοκτόνα. Εξετάστηκαν 11 δείγματα ξενιστή πιπεριάς, 60 δείγματα ξενιστή ροδακινιάς, 43 δείγματα ξενιστή καπνού, 5 δείγματα ξενιστή *Capsella bursa pastoris* και 2 δείγματα κάρδαμου (*Lepidum Drada*) από το Νεόκαστρο (Μελίκη Ημαθίας), 2 δείγματα ξενιστή ροδακινιάς από την Αλεξάνδρεια (Ημαθίας), 7 δείγματα ξενιστή πιπεριάς από το Τυμπάκι (Ηράκλειο Κρήτης) και 2 δείγματα ξενιστή πιπεριάς από τη Ιεράπετρα (Λασιθίου Κρήτης). Όλα τα δείγματα βρέθηκαν ευαίσθητα καθώς κανένα δεν έφερε τη μετάλλαξη αυτή. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω πίνακα, κανένα υπό εξέταση δείγμα δεν βρέθηκε ανθεκτικό (Πίνακας 5.1).

Πίνακα 5.1: Αποτελέσματα μελέτης

Περιοχή	Ξενιστής	Αριθμός Δειγμάτων	RFLP's	Ημερομηνία περισυλλογής
Νεόκαστρο (Μελίκη Ημαθίας)	Πιπεριά	11	SS	9/7/2012
	Ροδακινιά	60	SS	23/4/2013, 25/4/2013, 30/4/2013
	Καπνός	43	SS	25/4/2013, 1/6/2013, 25/7/2013
	<i>Capsella bursa pastoris</i>	5	SS	16/4/2013, 23/4/2013
	Κάρδαμος	2	SS	23/4/2013, 25/4/2013
Τυμπάκι (Ηράκλειο Κρήτης)	Πιπεριά	7	SS	16/6/2014
Αλεξάνδρεια (Ημαθίας)	Ροδακινιά	2	SS	15/4/2013
Ιεράπετρα (Λασιθίου Κρήτης)	Πιπεριά	2	SS	25/6/2014

6. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, η σωστή διαχείριση των φυσικών εχθρών στα πλαίσια προγραμμάτων της Ολοκληρωμένης Καταπολέμησης Εχθρών (Integrated Pest Management, IPM) είναι επιτακτική. Ένας τρόπος για την επιτυχία των προγραμμάτων αυτών είναι η χρησιμοποίηση εκλεκτικών εντομοκτόνων. Η εκλεκτικότητα των εντομοκτόνων μπορεί να προέλθει με οικολογικές είτε με φυσικές μεθόδους. Οι πρώτες επιτυγχάνονται με μείωση της έκθεσης των φυσικών εχθρών σε κάθε εφαρμογή εντομοκτόνου (Croft *et al.* 1975), ενώ οι τελευταίες με τη χρησιμοποίηση εντομοκτόνων τοξικών στα έντομα στόχους αλλά σχετικά μη τοξικών στους φυσικούς εχθρούς (Croft *et al.* 1975, Stark *et al.* 1995).

Η σημασία των φυσικών εχθρών στον έλεγχο των εντόμων που προσβάλλουν γεωργικές καλλιέργειες έχει αναδειχθεί σε πολλές εργασίες (DeBach & Rosen 1991, Obrycki & Kring 1998). Η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει δεκάδες φυσικούς εχθρούς του *M. persicae*, ικανούς να ελέγχουν τους πληθυσμούς των αφίδων τόσο στον αγρό, όσο και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες (Waage & Mills 1992, Price 1997). Ορισμένοι από αυτούς τους φυσικούς εχθρούς χρησιμοποιούνται σε προγράμματα βιολογικής καταπολέμησης.

Ως προς την ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή, προέκυψε από τη παρούσα μελέτη, σαν συνέχεια προηγούμενης μελέτης (Voudouris *et al.*), πως η μετάλλαξη R81T δεν έχει εμφανιστεί ακόμα σε πληθυσμούς *M. persicae* από την Ελλάδα. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι ευρέως διαδεδομένη σε οπωρώνες ροδακινιάς στη νότιο Γαλλία και στη βόρειο Ισπανία. Παρομοίως, στην Ιταλία το 65% των κλώνων αφίδας *M. persicae* που συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν, είχαν τη μετάλλαξη R81T. Σε αυτές τις μελέτες, οι αφίδες συλλέχθηκαν κυρίως από ροδακινιές και λίγες μόνο από βοτανώδεις σοδιές (μελιτζάνες, πιπεριές και καπνό). Επομένως, σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία, η μετάλλαξη R18T είναι διαδεδομένη μεταξύ των σεξουαλικών πληθυσμών *M. persicae*, αλλά δεν είναι γνωστό αν έχει περάσει σε ασεξουαλικούς πληθυσμούς, όπως αυτούς που έχουν χάσει εντελώς (υποχρεωτικά παρθενογενετικοί) ή μερικώς (λειτουργικά παρθενογενετικοί που επίσης παράγουν ελάχιστες

σεξουαλικές μορφές) τη σεξουαλική φάση σε ροδακινιές και αναπαράγονται παρθενογενετικά κατά τη διάρκεια του χρόνου.

Αξίζει να σημειώσουμε πως έχει παρατηρηθεί ότι οι πληθυσμοί αφίδων μεταξύ νοτιο-δυτικής Ευρώπης και βορείου Ελλάδας διαφέρουν ως προς τη γενετική τους σύσταση με περιορισμένη γενετική ροή ανάμεσά τους. Παρ' όλα αυτά, αξίζει να αναφερθεί ότι έχει καταγραφεί μετανάστευση αφίδας από τη δυτική Ευρώπη σε περιοχές της Μεσογείου, εξαιτίας του διασκορπισμού σε μεγάλη απόσταση ασεξουαλικών γενότυπων (γνωστών ως «υπερκλώνων») με τη βοήθεια της ανθρώπινης δραστηριότητας (παγκόσμιο εμπόριο). Επομένως, είναι πολύ πιθανό οι γενότυποι που φέρουν τη μετάλλαξη R81T να φθάσουν εν τέλει στην Ελλάδα με την επιπλέον διαλογή στο κοντινό μέλλον να είναι επιτακτική, ειδικά σε εισαγόμενα φυτικά υλικά και σε περιοχές που αναμένεται η καθιέρωση των εισβαλόμενων γενότυπων (π.χ. σοδιές κοντά σε αεροδρόμια, λιμάνια και σύνορα της χώρας). Ακόμα, φαίνεται η ανάγκη παρακολούθησης (monitoring) της ανθεκτικότητας της αφίδας και η χρησιμοποίηση του κατάλληλου κάθε φορά εντομοκτόνου, η ορθολογική χρήση των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων.

Κλείνοντας, τονίζουμε ότι το πρόβλημα της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* στην Ελλάδα είναι ιδιαίτερα σημαντικό και τα τελευταία χρόνια έχει λάβει ανησυχητικά επίπεδα. Η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς έχει αναπτύξει ισχυρή ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά, με αποτέλεσμα σε αυτές τις δύο κατηγορίες να αναμένεται αποτυχία της χρησιμότητας αυτών των εντομοκτόνων. Ανθεκτικότητα επίσης, έχει αναπτυχθεί στα πυρεθροειδή αν και όχι στο ίδιο βαθμό με τις δύο προηγούμενες κατηγορίες εντομοκτόνων. Τα νεονικοτινοειδή φαίνεται ότι είναι τα μόνα εντομοκτόνα που μπορούν να ελέγξουν αποτελεσματικά τους πληθυσμούς της αφίδας τόσο στη ροδακινιά όσο και στον καπνό. Συνεπώς, χρειάζεται ορθολογική χρήση και προγραμματισμός διαχείρισης της ανθεκτικότητας του εντομοκτόνου. Ένα μέτρο προς τη σωστή κατεύθυνση είναι η αποφυγή περιττών επεμβάσεων.

Η μελέτη των βιολογικών και δημογραφικών χαρακτηριστικών των αρπακτικών εντόμων σε συνθήκες εργαστηρίου δίνουν μια βασική εικόνα άλλα χρειάζονται πειράματα

αγρού για να βγουν περισσότερα συμπεράσματα ως προς την δυναμική του κάθε ενός.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι η *M. persicae* είναι είδος , που στην Ελλάδα έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε όλες τις ομάδες εντομοκτόνων εκτός από τα νεονικοτινοειδή αλλά προβλέπεται σύντομα να αναπτύξει και σε αυτά. Ο πολυμορφισμός στο βιολογικό κύκλο και η παραλλακτικότητα σε διάφορα χαρακτηριστικά της βιολογίας της, είναι παράγοντες που συνεισφέρουν στη γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας της *Myzus persicae*.

7. Βιβλιογραφία

Anthon, E.W., (1955) Evidence for green peach aphid resistance to organophosphorous insecticides. J. Econ. Entomol. 48, 56e57.

Bass C., Puinean A. M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Laura Paul V., Crosssthaite A. J., Denholm I., Field L. M., Foster S. P., Lind R., Williamson M. S., Slater R. (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*

Blackman R.L. (1971) Variation in the photoperiodic response within natural populations of *M. persicae* (Sulzer). Bulletin of Entomological Research. 60:533-544

Blackman R. L.(1972) The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem., Aphididae). Bulletin of Entomological Research. 62: 281-294.

Blackman R. L. (1974) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. Bulletin of Entomological Research. 63: 595-607.

Blackman R. L.(1975a) Aphids. Ginn & Co., Aylesbury, 175pp.

Blackman R. L.(1978) Early development of the parthenogenetic egg in three species of aphids (Homoptera: Aphididae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 7: 33-44.

Blackman, R. L.(1980a) Chromosomes and parthenogenesis in aphids. In: R. L. Blackman, G. M. Hewitt and M. Ashburner (eds), Insect Cytogenetics, pp. 133-148. 10th Symposium of the Royal Entomological Society of London, Oxford: Blackwell.

Blackman R. L.(1980b) Chromosome numbers in the Aphididae and their taxonomic significance. Systematic Entomology. 5: 7-25.

Blackman R. L.(1987) Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Homiptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (Nectarosiphon) species. Bulletin of Entomological Research. 77: 713-730.

- Blackman R. L. and H. Takada.**(1975) A naturally occurring chromosomal translocation in *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Entomology*. 50: 147-156.
- Blackman R. L. and V. F. Eastop,**(1984) *Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide*. John Wiley & Sons Publications, London.
- Blackman R. L. and J. M. Spence.** (1992) Electrophoretic distinction between the peach-potato aphid, *Myzus persicae* and the tobacco aphid, *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological research*. 82: 161-165.
- Blackman R.L. & Spence J.M.** (1994) The effects of temperature on aphid morphology, using a multivariate approach. *European Journal Entomology*, 91, 7-22
- Blackman R.L & Eastop V.F.** (2000) *Aphids on the World's Crops. An Identification And Formation Guide*. Second Edition. John Wiley & Sons, London.
- Blackman R. L. & V.F. Eastop.**(2007) Taxonomic issues. H.F. van Emden and R. Harrington (eds.). *Aphids as crop pests*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 716 pp.
- Blackman R. L., J. M. Spence, L. M. Field & Devonshire A. L.**(1999) Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity*, 82: 180- 186.
- Beaudoin A**(2013) control of horticultural pests with the novel insecticide Sivanto. In “ESA 61st Annual meeting – Entomology 2013, Science impacting a connected world, “10-13 November, Austin TX, US.
- Bruck E, Elbert A, Fischer R, Krueger S, Kuhnhold J, Klueken AM, Nauen R, Niebes JF, Reckmann U, Schnorbach HJ, Steffens R, van Waetermeulen X** (2009) Movento[®], an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pests control in agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Protection* 28:838-844.
- Brunt A.A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson.**(1996) *Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Cab International.
- Carver M**(1987) Biological control of aphids, in *Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. A, ed. by MinksAK and Harrewijn P. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 141–166.

Cox D., Denholm I. & Devonshire A. (2004) Monitoring of insecticide resistance in *Myzus persicae* from Greece. pp. 275-280 in Simon, J.-C., Dedryver, C.A., Rispe, C. & Hüllé, M. (Eds.) Aphids in a new millennium. INRA Editions, Paris.

Caillaud M.C (1999) Behavioural correlates of genetic divergence due to host specialization in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 227-232.

Denholm I., Cahill M., Dennehy T.J. and A.R. Horowitz.(1998) Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B*, 353: 1757-1767.

Denholm I. & Devine G.(2001) Insecticide resistance. In: *Encyclopedia of Biodiversity* (Ed. by S.A.Levin), pp. 465-477. San Diego: Academic Press.

Denholm I. & Jespersen J. B.(1998) Insecticide resistance management in Europe: recent developments and prospects. *Pesticide Science*, 52: 153- 159.

Devine G.J., Harling Z.K., Scarr A.W. & Devonshire A.L.(1996) Resistance to lethal and sublethal effects of imidacloprid in nicotine tolerant *Myzus nticotianae* and *Myzus persicae*. *Pesticide Science*, 48: 57-62.

Dixon, A.F.G. (1994) Individuals, populations and patterns. pp. 449-476. In Leather, S.R., Watt, A.D., Mills, W.J. & Walters, K.F.A. (Eds), *Individuals, Populations and Patterns in Ecology*. Intercept, Andover.

Dixon, A. F. G.(1998) *Aphid Ecology*. Second Edition. Chapman and Hall, London, U.K., 300 pp.

Edelson J., Duthie J. and Roberts W.(2002) Toxicity of biorational insecticides: activity against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Management Science*, 58: 255–260.

Eastop V.F. (1973) Deductions from the present day host plants of aphids and related insects. In *Insect/Plant Relationships*. Symposium of the Royal Entomological Society. London. Vol. 6, pp. 157-178.

- Field L. & Blackman R.** (2003) Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 107–113.
- Foster S. P., Harrington R., Devonshire A. L., Denholm I., Clark S. J., and M. A. Muggleston**(1997) Evidence for a possible fitness trade off between insecticide resistance and the low temperature movement that is essential for survival of UK populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 87: 573–579.
- Foster S. P., Denholm I., and A. L. Devonshire**(2000) The ups and downs of insecticide resistance in peach – potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. *Crop Protection*, 19: 873–879.
- Foster SP, Harrington R, Dewar AM, Denholm I and Devonshire AL**,(2002) Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 58: 895–907.
- Guldemond J.A.** (1990a) On aphids, their host plants and speciations. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Guldemond J.A.** (1990b) Choice of host plant as a factor in reproductive isolation of the aphid genus *Cryptomyzus* (Homoptera: Aphididae). *Ecological Entomology*, 15, 43-51.
- Ιωαννίδης Φ.Μ.** (1999) Προβλήματα ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα στην Ελλάδα. Αντιμετώπιση της Ανθεκτικότητας των Εντόμων στα Εντομοκτόνα. Θεσ/νίκη 1999.σελ. 39-54.
- Hayashi N, Sasama Y, Takahashi N, Ikemi N.** (2013) Cyflumetofen, a novel acaricide – its mode of action and selectivity. *Pest Manag Sci.* 69:1080-4.
- Katis N., Chrysoschoou A. & Woods R.**(1993) Tobacco viruses in Greece. in Abstract volume of Coresta Congress, Spain, p. 159.
- Karagounis C, Kourdoumbalos AK, Margaritopoulos JT, Nanos GD and Tsitsipis JA**,(2006) Organic farming-compatible insecticides against the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) in peach orchards. *Journal of Applied Entomology*, 130:150–154.
- Kennedy J.S., M.F. Day, and V.F. Eastop.**(1962) A Conspectus of Aphids as Vectors of

Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, 114pp.

Kirst H.A. (2010) The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research *The Journal of Antibiotics* 63, 101-111

Kindlman P. & Dixon A.F.G. (1994) Evolution of host range in aphids. *European Journal of Entomology*, 91, 91-96.

Mackenzie A. & Guldmond J.A. (1994) Sympatric speciation in aphids. II. Host race formation in the face of gene flow. pp. 379-396. In Leather, S.R., Watt, A.D., Mills, N.J. & Walters, K.F.A. (Eds). *Individuals, Populations and Patterns in Ecology*. Intercept, Andover.

Mackenzie A. (1996) A trade-off for host plant utilization in the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Evolution*, 50, 155-162.

Μαργαριτόπουλος Ι. (2001) Μελέτη της βιολογίας πληθυσμών του συμπλόκου είδους *Myzus persicae*. Διδακτορική Διατριβή. Νέα Ιωνία Μαγνησίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Margaritopoulos J.T., Mamuris Z. and Tsitsipis J.A. (1998) Attempted discrimination of *Myzus persicae* (Sulzer) and *Myzus nicotianae* Blackman (Homoptera: Aphididae) by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction technique. *Annals of the Entomological Society of America*, 91: 602–607.

Margaritopoulos J.T., Tsitsipis J.A., Zintzaras E. and Blackman R.L. (2000) Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 233–244.

Margaritopoulos J. T. (2001) Μελέτη των πληθυσμών του συμπλόκου είδους *Myzus persicae*

Margaritopoulos J.T., Tsitsipis J.A., Goundoudaki S. & Blackman R.L. (2002) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, 92: 309-320.

Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL and Williamson MS. (1999) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 8: 339– 346.

- Müller F. P.**(1954) Holozyklie und Anholozyklie bei der grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulzer). Zeitschrift für angewandte Entomologie. 36: 369- 380.
- Müller F. P.**(1958) Binomische Rassen der grünen Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* (Sulzer). Arch. Freunde NatGesch. Mecklenb. 4: 200-233.
- Morita M, Ueda T, Yoneda T, Koyanagi T and Haga T** (2007) Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. PestManag Sci 63:696-973
- Nakahira K** (2011) Strategy for discovery of a novel miticide Cyenopyrafen which is one of electron transport chain inhibitors. J. Pestic. Sci. 36, 511-515
- Nauen R. and Denholm I.**(2005) Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 58:200–215.
- Nauen R., Strobel J., Otsu K., Tietjen K., Erdelen C. & Elbert A.**(1996) Aphicidal activity of imidacloprid against a carbamate and organophosphite resistant Japanese strain of the tobacco feeding form of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) closely related to *Myzus nicotianae*. Bulletin of Entomological Research, 86: 165-171.
- Perring T.M., Gruenhagen N.M. and Farra C.A.**(1999) Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. Annual Review of Entomology, 44: 457–481.
- Price P.W.**(1997) Insect Ecology. New York, John Wiley & Sons.
- Selby TP, Lahm GP, Stevenson TM, Hughes KA, Cordova D, Annan IB, Barry JD, Benner EA, Currie MJ, Pahutski TF** (2013) Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 23:6341-6345
- Sparks TC, Watson GB, Loso MR, Geng C, Babcock JM, Thomas JD** (2013) Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. Pesticide Biochemistry and Physiology 107:1-7.
- Shands W.A., Simpson G.W. and Wave H.E.**(1969) Canada Plum, *Prunus nigra* Aiton, as a Primary Host of the Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in North-eastern Maine.

Sunnucks P., Driver F., Brown W.V., Carver M., Hales D.F. & Milne W.M. (1997) Biological and genetic characterization of morphologically similar *Therioaphis trifolii* (Hemiptera: Aphididae) with different host utilization. *Bulletin of Entomological Research*, 87, 425-436.

Σκούρας Π.Ι., Μαργαριτόπουλος Ι., Ζάρπας Κ.Δ. και Τσιτσιπής Ι. (2007) Μελέτη δημογραφικών παραμέτρων σε αρπακτικά είδη της οικογένειας Coccinellidae. Πρακτικά 12ου Πανελλήνιου Εντομολογικού Συνεδρίου, 13-16 Νοεμβρίου 2007, Λάρνακα, Κύπρος (υπό εκτύπωση).

Tomiuk J. (1990) Genetic stability in aphid clones and its implication for host-plant interactions. pp. 273-288. In Campbell, R.K. & Eikenbary, R. D. (Eds). *Aphid-Plant Genotype Interactions*. Amsterdam: Elsevier Press.

Tzortzi M. E. (2005) Μελέτη της γενετικής δομής του *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) και της ανθεκτικότητάς του σε εντομοκτόνα.

van Emden H. F., V. F Eastop, R. D. Hughes & M. J. Way. (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology*. 14: 197-270.

Voudouris C. C., Kati A. N., Sadikoglou E., Williamson M., Skouras P. J., Dimotsiou O., Georgiou S., Fenton B., Skavdis G., Margaritopoulos J. T. (2015) Insecticide resistance status of *Myzus persicae* in Greece: long-term surveys and new diagnostics for resistance mechanisms

Vontas J., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis N., Loukas M. & Hemingway J. (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology*, 11: 329-336.

Vontas et al. (2015) Τελευταίες εξελίξεις και νέες τάσεις στα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα.

Waage J.K. & Mills N.J. (1992) Biological control. pp 412-430 in Crawley, M. (Ed.) *Natural Enemies*. Oxford, Blackwell.

Waldhauer W.(1953) Über Rassendifferenzierung im Formenkreis der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer). NachrBl. dt. PflSchutzdienst, Berl. 7: 95-99.

Waldhauer W. (1957) Untersuchungen an Klonen der Grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulzer) zur Frage ihrer virginogenen Überwinterung. (Inaug. Diss.) 115 pp. Bonn, Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer) Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität.

Walker F. (1850) Description of aphids. Annals of the Magazine of Natural History, 2, 14-28.